

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 944 610**

51 Int. Cl.:

C09B 23/01 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

C07D 209/20 (2006.01)

C07D 209/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.09.2017 PCT/US2017/050641**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.03.2018 WO18049132**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.09.2017 E 17849593 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.03.2023 EP 3510399**

54 Título: **Colorantes NIR dirigidos a PSMA y sus usos**

30 Prioridad:

09.09.2016 US 201662385528 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

22.06.2023

73 Titular/es:

**ON TARGET LABORATORIES, LLC (100.0%)
Kurz Purdue Technology Center 1281 Win
Hentschel Blvd.
West Lafayette, Indiana 47906, US**

72 Inventor/es:

**KULARATNE, SUMITH A. y
GAGARE, PRAVIN**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 944 610 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Colorantes NIR dirigidos a PSMA y sus usos

Campo de la invención

La presente divulgación se encuentra en el área del diagnóstico. Esta divulgación proporciona métodos para sintetizar y utilizar grupos de unión de polietilenglicol que se conjugan con un compuesto usado para el diagnóstico por imagen dirigido de tumores, incluyendo el antígeno prostático específico de membrana (PSMA), tal como cáncer de próstata y enfermedades relacionadas. La conjugación de grupos aminoácidos con los colorantes fluorescentes aumenta la especificidad y la detección del compuesto. Se contemplan métodos de fabricación y síntesis de los compuestos para su uso en el diagnóstico por imagen.

Antecedentes de la invención

La próstata es uno de los órganos reproductores masculinos que se encuentran en la pelvis, debajo de la vejiga urinaria. Su función es producir y almacenar líquido seminal, que proporciona nutrientes y fluidos vitales para la supervivencia de los espermatozoides que se introducen en la vagina durante la reproducción. Como muchos otros tejidos, las glándulas prostáticas también son propensas a desarrollar tumores o bien malignos (cancerosos) o bien benignos (no cancerosos). La Sociedad Americana Contra el Cáncer predijo que a más de 230.000 hombres se les diagnosticaría cáncer de próstata y más de 30.000 morirían de esta enfermedad en el año 2005. De hecho, el cáncer de próstata es uno de los cánceres masculinos más comunes en las sociedades occidentales, y es la segunda forma principal de neoplasia maligna entre los hombres estadounidenses. Los métodos actuales de tratamiento del cáncer de próstata incluyen terapia hormonal, radioterapia, cirugía, quimioterapia, terapia fotodinámica y terapia combinada. La selección de un tratamiento varía generalmente en función del estadio del cáncer. Sin embargo, muchos de estos tratamientos afectan a la calidad de vida del paciente, especialmente en aquellos hombres a los que se les diagnostica cáncer de próstata por encima de los 50 años. Por ejemplo, el uso de fármacos hormonales a menudo va acompañado de efectos secundarios tales como osteoporosis y daño hepático. Tales efectos secundarios podrían mitigarse mediante el uso de tratamientos que sean más selectivos o específicos para el tejido responsable del estado patológico y eviten tejidos inespecíficos como los huesos o el hígado. Tal como se describe en el presente documento, el antígeno prostático específico de membrana (PSMA) representa una diana para tales tratamientos selectivos o específicos.

La extirpación quirúrgica de la enfermedad maligna constituye una de las opciones terapéuticas más comunes y eficaces para el tratamiento primario del cáncer. La resección de todas las lesiones malignas detectables da como resultado un retorno no detectable de la enfermedad en aproximadamente el 50% de los pacientes con cáncer y puede prolongar la esperanza de vida o reducir la morbilidad de los pacientes en los que se observa recidiva del cáncer. No es de extrañar que los métodos quirúrgicos para lograr una citorreducción más cuantitativa estén siendo objeto de mayor escrutinio.

La resección de todas las lesiones malignas detectables da como resultado un retorno no detectable de la enfermedad en aproximadamente el 50% de los pacientes con cáncer y puede prolongar la esperanza de vida o reducir la morbilidad de los pacientes en los que se observa recidiva del cáncer. Dada la importancia de la resección total de las lesiones malignas, es beneficioso asegurarse de que estas lesiones malignas se identifican de manera precisa y completa. Actualmente, la identificación del tejido maligno durante la cirugía se realiza mediante tres métodos. En primer lugar, muchas masas y nódulos tumorales pueden detectarse visualmente basándose en color, textura y/o morfología anómalos. Por tanto, una masa tumoral puede presentar un color abigarrado, parecer asimétrica con un borde irregular o sobresalir de los contornos del órgano sano. Una masa maligna también puede reconocerse al tacto debido a diferencias de plasticidad, elasticidad o solidez con respecto a los tejidos adyacentes. Por último, algunos focos de cáncer pueden localizarse intraoperatoriamente usando colorantes fluorescentes que fluyen pasivamente desde el tumor primario hasta los ganglios linfáticos de drenaje. En esta última metodología, los ganglios linfáticos fluorescentes (centinelas) pueden identificarse visualmente, researse y examinarse para determinar si las células cancerosas han metastatizado en estos ganglios linfáticos.

El nombre de PSMA se debe en gran parte a su mayor nivel de expresión en las células de cáncer de próstata; sin embargo, su función particular en las células de cáncer de próstata sigue sin resolverse. PSMA se sobreexpresa en los tejidos malignos de la próstata en comparación con otros órganos del cuerpo humano tales como el riñón, el intestino delgado proximal y las glándulas salivales. PSMA también se expresa en la neovascularización de la mayoría de los tumores sólidos. Aunque PSMA se expresa en el cerebro, esa expresión es mínima, y la mayoría de los ligandos de PSMA son polares y no son capaces de penetrar la barrera hematoencefálica. PSMA es una glicoproteína de tipo II unida a la membrana de la superficie celular con un peso molecular de ~110 kD, que incluye un segmento intracelular (aminoácidos 1-18), un dominio transmembrana (aminoácidos 19-43) y un extenso dominio extracelular (aminoácidos 44-750). Mientras que actualmente se cree que las funciones del segmento intracelular y de los dominios transmembrana son insignificantes, el dominio extracelular está implicado en varias actividades distintas. PSMA desempeña un papel en el sistema nervioso central, donde metaboliza N-acetil-aspartil-glutamato (NAAG) para dar los ácidos glutámico y N-acetilaspártico. Por consiguiente, a veces también se denomina dipeptidasa ácida ligada a N-acetil alfa (NAALADasa). PSMA también se denomina a veces folato hidrolasa I (FOLH

I) o glutamato carboxipeptidasa (GCP II) debido a su papel en el intestino delgado proximal, donde elimina el glutamato ligado a γ del folato poli- γ -glutamado y el glutamato ligado a α de péptidos y moléculas pequeñas.

PSMA también comparte similitudes con el receptor de transferrina humano (TfR), ya que tanto PSMA como TfR son glicoproteínas de tipo II. Más específicamente, PSMA muestra un 54% y un 60% de homología con TfR1 y TfR2, respectivamente. Sin embargo, aunque TfR sólo existe en forma dimérica debido a la formación de enlaces sulfhidrilo entre cadenas, PSMA puede existir en forma dimérica o monomérica.

A diferencia de muchas otras proteínas unidas a la membrana, PSMA experimenta una rápida internalización en la célula de manera similar a los receptores unidos a la superficie celular, como los receptores de vitaminas. PSMA se internaliza a través de fosas recubiertas de clatrina y, posteriormente, puede o bien recircularse a la superficie celular o bien ir a los lisosomas. Se ha sugerido que las formas de dímero y monómero de PSMA son interconvertibles, aunque está debatiéndose la evidencia directa de la interconversión. Aun así, sólo el dímero de PSMA posee actividad enzimática, y el monómero no.

Aunque el papel de PSMA en la superficie celular de las células de cáncer de próstata aún se desconoce, se ha reconocido que PSMA representa una diana viable para la administración selectiva y/o específica de agentes biológicamente activos, incluyendo agentes de diagnóstico, agentes de diagnóstico por imagen y agentes terapéuticos, a tales células de cáncer de próstata.

El radioinmunoconjugado del anticuerpo monoclonal (AcM) anti-PSMA 7E11, conocido como gammagrafía PROSTASCINT®, está usándose actualmente para diagnosticar la metástasis y la recidiva del cáncer de próstata. Sin embargo, este agente tiende a producir imágenes difíciles de interpretar (Lange, P.H. PROSTASCINT scan for staging prostate cancer. *Urology* 2001, 57, 402-406; Haseman, M.K.; *et al.* Cancer Biother Radiopharm 2000, 15, 131-140; Rosenthal, S.A.; *et al.* Tech Urol 2001, 7, 27-37). Se une a un epítipo intracelular de PSMA en células de cáncer de próstata necróticas. Más recientemente, se han desarrollado anticuerpos monoclonales que se unen al dominio extracelular de PSMA y se han radiomarcado y se ha demostrado que se acumulan en modelos de tumores de próstata positivos para PSMA en animales. Sin embargo, el diagnóstico y la detección de tumores usando anticuerpos monoclonales se han visto limitados por la baja permeabilidad debido a su gran tamaño [peso molecular (PM) ~150.000 Da] y la lenta eliminación a partir del tejido inespecífico. Además, el direccionamiento selectivo de los agentes de diagnóstico por imagen óptica o radiografía, o bien para diagnóstico por imagen o bien para fines terapéuticos, es un desafío debido a su larga semivida (~ 30 días). Especialmente, los pacientes deben permanecer en el hospital durante más días y gastar más dinero en facturas médicas.

Actualmente están investigándose intensamente dos enfoques prometedores para la cirugía guiada por fluorescencia para su uso en la práctica clínica. En un método, una sonda fluorescente NIR activable, que es mínimamente fluorescente en estado estacionario debido a su proximidad a un extintor adjunto, se vuelve altamente fluorescente tras la liberación del extintor en tejido maligno. Uno de los mecanismos de liberación más comúnmente usados implica la incorporación de una secuencia peptídica entre el colorante y el extintor que puede escindir-se específicamente por una proteasa enriquecida en el tumor (es decir, catepsinas, caspasas y metaloproteinasas de matriz). Una ventaja importante de esta estrategia radica en la ausencia de fluorescencia en los tejidos que carecen de la enzima activadora, lo que permite que los tejidos a lo largo de la ruta de excreción (por ejemplo, riñones, vejiga, hígado) permanezcan no fluorescentes a menos que expresen fortuitamente la enzima de escisión. Tales colorantes NIR activados por tumores también pueden generar una fluorescencia sustancial en la masa tumoral siempre que la lesión maligna se enriquezca en la proteasa de escisión y el colorante liberado se retenga en el tumor. La principal desventaja de esta metodología surge de las escasas especificidades tumorales de muchas de las hidrolasas relevantes (la mayoría de las cuales también se expresan en tejidos sanos que se someten a una remodelación natural o experimentan inflamación). Además, la abundancia de las proteasas deseadas puede variar entre las masas tumorales, lo que conduce a una activación lenta o nula de la fluorescencia en algunas lesiones malignas y a un rápido desarrollo de la fluorescencia en otras. La mayoría de las veces, estos péptidos activables contienen más de 20 aminoácidos unidos a través de enlaces peptídicos que podrían conducir a pesos moleculares más altos, mayor tiempo de anticipación diagnóstica (24 horas), ruptura de enlaces peptídicos por peptidasa en la circulación, muchos resultados falsos positivos y costes de fabricación muy altos.

Otros mecanismos de liberación que usan los colorantes activables son la diferencia de pH entre la circulación y dentro del tumor o el cambio en el potencial redox.

En el segundo, un colorante fluorescente se conjuga con un ligando dirigido específico del tumor que hace que el colorante unido se acumule en los cánceres que sobreexpresan el receptor del ligando. Si bien los conjugados de colorante NIR-anticuerpo dirigido a PSMA aún no se han ingresado a ensayos clínicos para la cirugía de cáncer guiada por fluorescencia, varios tipos de colorantes NIR se han conjugado con anticuerpos monoclonales tales como Her-2 con la intención de desarrollo clínico. Desafortunadamente, la mayoría de estos colorantes están unidos a anticuerpos de manera inespecífica a través de la química de amida, disulfuro o maleimida usando residuos o bien de lisina o bien de cisteína en la proteína que conducen a entidades químicas heterogéneas que dan como resultado afinidades, eficacias, PK y perfiles de seguridad variables. Además, se sabe que los enlaces maleimida y disulfuro son inestables en la circulación (semivida: ≤ 2 h). Por otro lado, la falta de una definición estructural precisa puede limitar la progresión de estos conjugados hacia el uso clínico debido a los desafíos asociados con el procedimiento

de producción y la seguridad. Además, la producción de estos anticuerpos (PM ~150.000 Da) es muy costosa en comparación con los ligandos moleculares pequeños. En cambio, el ligando de molécula pequeña (PM >0,5 Da) puede penetrar en tumores sólidos rápidamente y se elimina de los tejidos negativos para PSMA en <2 h, muestra altas razones de tumor con respecto a fondo, es fácil de sintetizar y es estable durante la síntesis y el almacenamiento.

A pesar de todas las ventajas que tienen esos pequeños ligandos moleculares, el desarrollo de un colorante NIR que mantenga o mejore las propiedades de la molécula pequeña es un desafío. Recientemente, una variedad de inhibidores de PSMA de bajo peso molecular se han conjugado con colorantes de longitud de onda de luz visible (400 - 600 nm) tales como la fluoresceína y la rodamina y se han sometido a prueba en modelos animales [Kularatne SA, Wang K, Santhapuram HK, Low PS. *Mol Pharm.* mayo-junio de 2009;6(3):780-9] o en células en cultivo [Liu T, Nedrow-Byers JR, Hopkins MR, Berkman CE. *Bioorg Med Chem Lett.* 1 de diciembre de 2011;21(23)] o en muestras de sangre humana (He W, Kularatne SA, Kalli KR, Prendergast FG, Amato RJ, Klee GG, Hartmann LC, Low PS. *Int J Cancer.* 15 de octubre de 2008;123(8):1968-73).

Los colorantes de longitud de onda de luz visible no son óptimos para la cirugía guiada por imágenes intraoperatoria, ya que estos colorantes están asociados con un nivel relativamente alto de luz de fondo inespecífica debido a la presencia de colágeno en los tejidos. Por tanto, la relación de señal con respecto a ruido de estos compuestos convencionales es baja. Además, la absorción de la luz visible por los cromóforos biológicos, en particular la hemoglobina, limita la profundidad de penetración a unos pocos milímetros. Por tanto, los tumores que están enterrados a más de unos pocos milímetros en el tejido normalmente no se detectan. Además, el equilibrio de ionización de la fluoresceína (pKa = 6,4) conduce a una absorción y emisión dependientes del pH en un intervalo de 5 a 9. Por tanto, la fluorescencia de los colorantes basados en fluoresceína se extingue a un pH bajo (por debajo de pH 5).

Por tanto, los colorantes NIR conjugados con ligandos de molécula pequeña que se dirigen a PSMA [(a) Humblet V, Lapidus R, Williams LR, Tsukamoto T, Rojas C, Majer P, Hin B, Ohnishi S, De Grand AM, Zaheer A, Renze JT, Nakayama A, Slusher BS, Frangioni JV. *Mol. Imaging.* octubre-diciembre de 2005;4(4):448-62.; (b) Thomas M, Kularatne SA, Qi L, Kleindl P, Leamon CP, Hansen MJ, Low PS.; (c) Chen Y, Dhara S, Banerjee SR, Byun Y, Pullambhatla M, Mease RC, Pomper MG. *Biochem Biophys Res Commun.* 18 de diciembre de 2009;390(3):624-9; (d) Nakajima T, Mitsunaga M, Bander NH, Heston WD, Choyke PL, Kobayashi H. *Bioconjug Chem.* 17 de agosto de 2011;22(8):1700-5.; (e) Chen Y, Pullambhatla M, Banerjee SR, Byun Y, Stathis M, Rojas C, Slusher BS, Mease RC, Pomper MG. *Bioconjug Chem.* 19 de diciembre de 2012;23(12):2377-85.; (f) Laydner H, Huang SS, Heston WD, Autorino R, Wang X, Harsch KM, Magi-Galluzzi C, Isac W, Khanna R, Hu B, Escobar P, Chalikonda S, Rao PK, Haber GP, Kaouk JH, Stein RJ. *Urology.* Febrero de 2013;81(2):451-6.; (g) Kelderhouse LE, Chelvam V, Wayua C, Mahalingam S, Poh S, Kularatne SA, Low PS. *Bioconjug Chem.* 19 de junio de 2013;24(6):1075-80.] se han sometido a prueba como agentes de diagnóstico por imagen en modelos murinos de cáncer de próstata.

Si bien estos colorantes NIR dirigidos a PSMA mostraron cierto marcaje de células de cáncer de próstata en cultivo, tenían una fluorescencia muy débil en modelos animales de xenoinjerto de tumor de próstata que expresa PSMA. Por ejemplo, las moléculas descritas por Humblet *et al.* han mostrado una acumulación tumoral y una fluorescencia muy bajas en los modelos de xenoinjerto tumoral. Puede deberse a la falta de un ligador adecuado entre el ligando, el colorante NIR puede haber impedido la unión del ligando al bolsillo de unión en PSMA. Por otro lado, los ligandos basados en fósforo tienen menos afinidad por PSMA en comparación con DUPA. Además, los ligandos basados en fósforo son difíciles de sintetizar, involucran múltiples etapas y serán costosos de fabricar.

El agente NIR dirigido a PSMA notificado en Chen *et al.* tarda más de 20 h en llegar al tumor y 72 h en eliminarse de los tejidos no dirigidos. También cabe destacar que este colorante NIR dirigido a PSMA tiene una eliminación cutánea muy lenta. Si bien el epítipo de unión de PSMA en las células transfectadas que usaron puede ser artificial, tuvo una absorción muy baja y una fluorescencia baja en el tumor de células de cáncer de próstata transfectadas con PSMA. Además, hay una absorción inespecífica sustancial de esta molécula en todos los demás tejidos y hay acumulación y fluorescencia en las células negativas para PSMA, lo que indica una naturaleza inespecífica y no dirigida del conjugado NIR notificado por Chen *et al.*

Chen *et al.* y Laydner *et al.* han conjugado un ligando de molécula pequeña con IR800CW (un colorante NIR). IR800CW es un colorante asimétrico con ácido carboxílico activado con éster de N-hidroxisuccinimida (NHS). Esta es una molécula extremadamente costosa de sintetizar y aún más de adquirir de los recursos disponibles comercialmente (1 g cuesta más de 60.000 USD). IR800CW también tiene la desventaja de que no es estable durante la síntesis debido a dos motivos: (a) hidrólisis del éster de NHS, (b) hidrólisis de vinil éter. La falta de estabilidad de los conjugados de IR800CW durante la síntesis conduce a la formación de más del 60% de subproductos no deseados. Esto requiere técnicas de purificación complejas que indiquen el camino hacia un mayor coste de producción, un mayor periodo de espera para la traducción clínica, y los cirujanos y los pacientes no tendrán acceso al fármaco.

Laydner *et al.* conjugaron un ligando de PSMA con IR800CW a través de un espacio peptídico largo (6 aminoácidos) y un ligador bifuncional con NHS y maleimida. Además de todas las desventajas provocadas por IR800CW, este conjugado de IR800CW dirigido a PSMA tiene un esquema de síntesis complicado que requiere la síntesis en cinco

etapas (síntesis de ligando, conjugación de ligando con ligador bifuncional a través del grupo funcional maleimida, síntesis de ligador peptídico, conjugación de ligador peptídico con IR800CW, conjugación de ligador peptídico-IR800CW con ligando-ligador bifuncional a través del enlace amida) en múltiples etapas. Por tanto, los costes de fabricación dificultan la producción eficaz de esta molécula con fines clínicos. El esquema de síntesis para estas moléculas se complica aún más debido a los múltiples centros quirales en la molécula. Sin embargo, los ligadores peptídicos poseen múltiples centros quirales (estereoisómeros) que normalmente requieren la necesidad de producción y evaluación de todos los estereoisómeros para la autorización de la FDA. Por ejemplo, un ligador peptídico que posea sólo 3 aminoácidos (es decir, 3 centros quirales) requeriría perfiles de toxicidad para 8 productos farmacéuticos diferentes, ya que estas mezclas heterogéneas podrían dar como resultado afinidades, eficacias, PK y perfiles de seguridad diferentes.

El ligando de molécula pequeña usado por Laydner *et al.* es GluNHCONHCys-SH. El resto de tiol libre en Cys tiende a oxidarse, por lo que la molécula debe manipularse en un ambiente de argón o nitrógeno y generalmente conduce a una molécula inestable. El ligando GluNHCONHCys-SH se conjuga con un ligador bifuncional a través de la reacción de maleimida. Está bien notificado que las reacciones entre tioles y maleimida son reversibles y producen el 50% del producto deseado. Además, los enlaces maleimida no son estables en circulación en el cuerpo humano, por lo que el uso de enlaces maleimida corre el riesgo de que se libere el colorante no dirigido conduciendo a una absorción inespecífica del mismo.

Kelderhouse *et al.* conjugaron DUPA-ligador-Cys con Alexa fluor 647 y Dylight 750 con DUPA a través del grupo maleimida. Nuevamente, estas moléculas tienen todas las desventajas asociadas con la maleimida. Además, estos colorantes NIR de baja longitud de onda, aunque están disponibles comercialmente, son muy caros. Si bien las moléculas se sometieron a prueba en un modelo de ratón metastásico experimental, las imágenes no fueron concluyentes.

Liu *et al.* también notificaron un colorante NIR dirigido a PSMA y algunos datos *in vitro*, pero no notificaron datos en animales. La falta de un ligador adecuado entre el ligando y el colorante NIR puede atribuirse a la falta de datos *in vivo*. Además, este colorante tiene muchos inconvenientes como otros compuestos notificados. Es un ligando basado en fósforo y un colorante asimétrico. Por tanto, tiene las desventajas descritas tanto de los ligandos basados en fósforo como de los colorantes NIR asimétricos.

Nakajima *et al.* notificaron anticuerpos anti-PSMA (J591) conjugados con ICG. Desafortunadamente, este compuesto tardó 72 horas en eliminarse de otros tejidos sanos, tales como el hígado. Además, el compuesto permaneció en circulación durante 6 días, lo que indica que permanecerá en el cuerpo durante más de 30 días en el cuerpo humano. Además, ICG se unió a J591 de manera inespecífica a través de amida usando cualquiera de los residuos de lisina en la proteína conduciendo a entidades químicas heterogéneas que dan como resultado afinidades, eficacias, PK y perfiles de seguridad variables. La falta de una definición estructural precisa puede limitar la progresión de estos conjugados para uso clínico debido a los desafíos asociados con el procedimiento de producción y la seguridad.

Una mayor inespecificidad y una eliminación lenta a partir de la piel de los colorantes NIR dirigidos a PSMA notificados pueden deberse a las malas propiedades farmacocinéticas (PK) de estos compuestos.

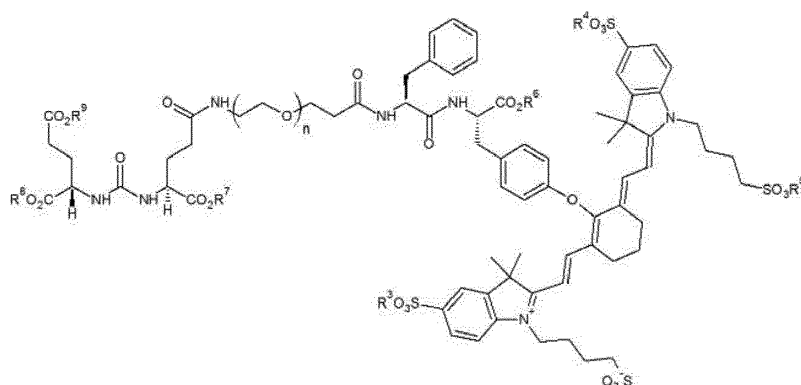
El documento US 9254341 da a conocer un procedimiento para la síntesis de un colorante de infrarrojo cercano (NIR) dirigido al antígeno prostático específico de membrana (PSMA).

Sigue existiendo la necesidad de una sustancia colorante que pueda usarse para dirigirse específicamente a células cancerosas que expresan PSMA o a la neovascularización del tejido enfermo con estabilidad mejorada, mejores propiedades PK, mayor solubilidad, rápida acumulación tumoral, alta fluorescencia, eliminación rápida a partir de la piel y mayores razones de tumor con respecto a fondo (TBR) para su uso en diagnóstico por imagen de tejido *in vivo* y para su uso en cirugía guiada por imágenes.

Breve resumen de la invención

Esta divulgación proporciona ligandos dirigidos a PSMA unidos a colorantes NIR a través de diferentes ligadores para mejorar las propiedades clínicas (por ejemplo, estabilidad, propiedades PK, solubilidad, rápida acumulación tumoral, mayor fluorescencia, eliminación rápida a partir de la piel y mayores razones de tumor con respecto a fondo) de los compuestos. La divulgación proporciona usos de los compuestos en cirugía guiada por imágenes y métodos para sintetizar los mismos. Esta divulgación proporciona además variación de la carga total del conjugado ligando-ligador-colorante NIR añadiendo cargas positivas al ligador o reduciendo el número de cargas negativas en las moléculas de colorante. Esta divulgación también proporciona novedosos ligandos de mayor afinidad para mejorar la afinidad *in vivo* y las propiedades PK de los conjugados NIR. Esta divulgación también proporciona compuestos para su uso en el diagnóstico por imagen dirigido de tumores que expresan PSMA, incluyendo pero sin limitarse a cáncer de próstata, y métodos de uso, por ejemplo, en diagnóstico por imagen y cirugía que implican tejidos y tumores positivos para PSMA.

La presente invención se refiere a un método para sintetizar un compuesto de la siguiente fórmula y su forma isotópica:



en la que n es 0, 1, 2, 3 o 4;

además, en la que R³, R⁴ y R⁵ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H⁺, Na⁺, K⁺ y NH₄⁺, R⁶, R⁷, R⁸ y R⁹ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H⁺, Na⁺, K⁺ y NH₄⁺, que comprende las etapas de las presentes reivindicaciones 1 y 2.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 representa la estructura química y los espectros de excitación y emisión de 1: OTL78.

La figura 2 ilustra la afinidad de unión relativa de 1: OTL78 con respecto a DUPA-FITC (14). Se incubaron células de cáncer de próstata humano 22Rv1 positivas para PSMA durante 1 h a 37°C en presencia de DUPA-FITC 100 nM con concentraciones crecientes de 1. A continuación se retiró el medio, se lavó con medio nuevo tres veces y se sustituyó por PBS. La fluorescencia unida a las células se analizó mediante citometría de flujo.

La figura 3 muestra la superposición de la imagen de fluorescencia de cuerpo entero sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral en el punto de tiempo de 2 h después de inyectar 1: OTL78 a ratones portadores de xenoinjertos de tumor de próstata. Se inyectaron 10 nmol de 1: OTL78 a un ratón portador de xenoinjerto de tumor de próstata humano 22Rv1 y se obtuvieron imágenes con el generador de imágenes IVIS (ex = 745 nm, em = ICG, tiempo de exposición = 1 s) a las 2 h tras la inyección.

La figura 4 representa la biodistribución tisular *ex vivo* de 1: OTL78 en ratones de la disección de la figura 3 después del diagnóstico por imagen de cuerpo entero.

La figura 5A demuestra la especificidad *in vivo* de 1: OTL78 usando diagnóstico por imagen de cuerpo entero con ratones desnudos portadores de tumores PC3 (negativos para PSMA).

La figura 5B demuestra la especificidad *in vivo* de 1: OTL78 usando la biodistribución tisular *ex vivo* de los ratones de la figura 5A.

Figura 6: Superposición de imágenes de fluorescencia de cuerpo entero o medio cuerpo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. Se inyectaron 10 nmol de 1: OTL78 a un ratón portador de xenoinjerto de tumor de próstata humano 22Rv1 y se obtuvieron imágenes con el generador de imágenes IVIS (ex = 745 nm, em = ICG, tiempo de exposición = 1 s) a diferentes intervalos de tiempo.

La figura 7A representa el cromatograma de CL/EM para el compuesto 8 en bruto: instrumento: Acquity UPLC, columna Waters: BEH C18, 1,7 μm, 2,1 × 50 mm. Eluyente A: NH₄OAc ac. 20 mM; eluyente B: ACN. Gradiente: el 5% de B - el 75% de B en 2,2 min siguiendo el programa de gradiente mostrado en la tabla #. Tiempo de desarrollo: 7 min. Velocidad de flujo: 0,35 ml/min. Detector: detector UV de 220 nm.

La figura 7B ilustra el cromatograma de CL/EM para el compuesto 8 en bruto: mismas condiciones de la figura 7A excepto que el detector es un detector UV de 263 nm.

La figura 7C muestra el cromatograma de CL/EM para el compuesto 8 en bruto: mismas condiciones de la figura 7A excepto que el detector es una matriz de diodos.

La figura 7D representa los espectros de masas del compuesto 8 en bruto analizado mediante espectrometría de masas de ionización por electropulverización en modo positivo, ilustrando el compuesto 8 en bruto + H (m/z 575,5) y su dímero (m/z 1150).

La figura 8A ilustra el cromatograma de CL/EM para el compuesto 9 en bruto: mismas condiciones de la figura 7A.

La figura 8B muestra el cromatograma de CL/EM para el compuesto 9 en bruto: mismas condiciones de la figura 7B.

La figura 8C representa el cromatograma de CL/EM del compuesto 9 en bruto: mismas condiciones de la figura 7C.

La figura 8D ilustra los espectros de masas para el compuesto 9 en bruto analizado mediante espectrometría de masas de ionización por electropulverización en modo positivo, ilustrando el compuesto 9 en bruto + H (m/z 441,5) y su dímero (m/z 882).

- 5 La figura 9A muestra el cromatograma de CL/EM para el compuesto 11 en bruto: mismas condiciones de la figura 7A.

La figura 9B representa el cromatograma de CL/EM del compuesto 11 en bruto: mismas condiciones de la figura 7B.

La figura 9C ilustra el cromatograma de CL/EM para el compuesto 11 en bruto: mismas condiciones de la figura 7C.

- 10 La figura 9D muestra los espectros de masas del compuesto 11 en bruto analizado mediante espectrometría de masas de ionización por electropulverización en modo positivo, ilustrando el compuesto 11 en bruto + H (m/z 734,86) y su dímero (m/z 1486,68).

La figura 10A representa el cromatograma de CL/EM del compuesto 12 en bruto: mismas condiciones de la figura 7A.

La figura 10B ilustra el cromatograma de CL/EM para el compuesto 12 en bruto: mismas condiciones de la figura 7B.

- 15 La figura 10C muestra el cromatograma de CL/EM para el compuesto 12 en bruto: mismas condiciones de la figura 7C.

La figura 10D representa los espectros de masas del compuesto 12 en bruto analizado mediante espectrometría de masas de ionización por electropulverización en modo positivo, ilustrando el compuesto 12 en bruto + H (m/z 600,7) y su dímero (m/z 1200).

- 20 La figura 11A ilustra el cromatograma de CL/EM para el compuesto 13 en bruto: mismas condiciones de la figura 7A.

La figura 11B muestra el cromatograma de CL/EM para el compuesto 13 en bruto: mismas condiciones de la figura 7B.

La figura 11C representa el cromatograma de CL/EM del compuesto 13 en bruto: mismas condiciones de la figura 7C.

- 25 La figura 11D ilustra los espectros de masas del compuesto 13 en bruto analizado mediante espectrometría de masas de ionización por electropulverización en modo positivo, ilustrando el compuesto 13 en bruto + H (m/z 1071,2) y su dímero (m/z 2142).

La figura 12A muestra el cromatograma de CL/EM después de la purificación del compuesto 5: mismas condiciones de la figura 7A.

- 30 La figura 12B representa el cromatograma de CL/EM después de la purificación del compuesto 5: mismas condiciones de la figura 7A.

La figura 12C ilustra el cromatograma de CL/EM después de la purificación del compuesto 5: mismas condiciones de la figura 7C.

- 35 La figura 12D muestra los espectros de masas después de la purificación del compuesto 5 analizado mediante espectrometría de masas de ionización por electropulverización en modo positivo, ilustrando el compuesto 5 + H (m/z 790,6).

La figura 13A ilustra el perfil del cromatograma de CL/EM de la mezcla de reacción en un intervalo de tiempo de 1 hora, monitorizando el avance de la reacción hasta cuatro horas.

- 40 La figura 13B muestra el perfil del cromatograma de CL/EM de la mezcla de reacción en un intervalo de tiempo de 2 horas, monitorizando el avance de la reacción hasta cuatro horas.

La figura 13C representa el perfil del cromatograma de CL/EM de la mezcla de reacción en un intervalo de tiempo de 3 horas, monitorizando el avance de la reacción hasta cuatro horas.

La figura 13D ilustra el perfil del cromatograma de CL/EM de la mezcla de reacción en un intervalo de tiempo de 4 horas, monitorizando el avance de la reacción hasta cuatro horas.

- 45 La figura 14A muestra el perfil del cromatograma de CL/EM de la mezcla de reacción en el punto de tiempo de 4 h a una longitud de onda UV de 220 nm. El método de CL/EM es el mismo que en la figura 7A.

La figura 14B representa el perfil del cromatograma de CL/EM de la mezcla de reacción en el punto de tiempo de 4 h

a una longitud de onda UV de 490 nm. El método de CL/EM es el mismo que en la figura 7A.

La figura 14C ilustra el perfil del cromatograma de CL/EM de la mezcla de reacción en el punto de tiempo de 4 h a una longitud de onda UV de 550 nm. El método de CL/EM es el mismo que en la figura 7A.

5 La figura 14D muestra el perfil del cromatograma de CL/EM de la mezcla de reacción en el punto de tiempo de 4 h a una longitud de onda UV de 775 nm. El método de CL/EM es el mismo que en la figura 7A.

La figura 15A representa el cromatograma de CL/EM después de la purificación del compuesto 5: mismas condiciones de la figura 7A.

La figura 15B ilustra el cromatograma de CL/EM después de la purificación del compuesto 5: mismas condiciones de la figura 7A.

10 La figura 15C muestra el cromatograma de CL/EM después de la purificación del compuesto 5: mismas condiciones de la figura 7C.

La figura 15D representa los espectros de masas después de la purificación del compuesto 5 analizado mediante espectrometría de masas de ionización por electropulverización en modo positivo, ilustrando el compuesto 5 + H (m/z 790,6).

15 La figura 15E ilustra el gráfico de longitudes de onda de la matriz de diodos tras la purificación del compuesto 5.

La figura 16A muestra el perfil del cromatograma de CL/EM de la mezcla de reacción en un intervalo de tiempo de 1 hora, monitorizando el avance de la reacción a una longitud de onda UV de 220 nm. El método de CL/EM es el mismo que en la figura 7A.

20 La figura 16B representa el perfil del cromatograma de CL/EM de la mezcla de reacción en un intervalo de tiempo de 1 hora, controlando el avance de la reacción a una longitud de onda UV de 775 nm. El método de CL/EM es el mismo que en la figura 7A.

La figura 16C ilustra el perfil del cromatograma de CL/EM de la mezcla de reacción en un intervalo de tiempo de 2 horas, monitorizando el avance de la reacción a una longitud de onda UV de 775 nm. El método de CL/EM es el mismo que en la figura 7A.

25 La figura 16D muestra el perfil del cromatograma de CL/EM de la mezcla de reacción en un intervalo de tiempo de 3 horas, monitorizando el avance de la reacción a una longitud de onda UV de 775 nm. El método de CL/EM es el mismo que en la figura 7A.

30 La figura 16E representa el perfil del cromatograma de CL/EM de la mezcla de reacción en un intervalo de tiempo de 4 horas, monitorizando el avance de la reacción a una longitud de onda UV de 775 nm. El método de CL/EM es el mismo que en la figura 7A.

35 La figura ilustra el perfil del cromatograma de CL/EM de la mezcla de reacción en el punto de tiempo de 4 h a una longitud de onda UV de 220 nm, el perfil del cromatograma de CL/EM de la mezcla de reacción en el punto de tiempo de 4 h a una longitud de onda UV de 490 nm, el perfil del cromatograma de CL/EM de la mezcla de reacción en el punto de tiempo de 4 h a una longitud de onda UV de 550 nm y el perfil del cromatograma de CL/EM de la mezcla de reacción en el punto de tiempo de 4 h a una longitud de onda UV de 775 nm. El método de CL/EM es el mismo que en la figura 7A.

La figura 18A muestra los perfiles del cromatograma de UPLC/EM de la mezcla de reacción en el punto de tiempo de 4 horas a una longitud de onda UV de 220 nm.

40 La figura 18B representa los perfiles del cromatograma de UPLC/EM de la mezcla de reacción en el punto de tiempo de 4 horas a una longitud de onda UV de 490 nm.

La figura 18C ilustra los perfiles del cromatograma de UPLC/EM de la mezcla de reacción en el punto de tiempo de 4 horas a una longitud de onda UV de 550 nm.

La figura 18D muestra los perfiles del cromatograma de UPLC/EM de la mezcla de reacción en el punto de tiempo de 4 horas a una longitud de onda UV de 775 nm.

45 La figura 19A representa los perfiles del cromatograma de CL/EM del compuesto 1: OTL78 a una longitud de onda UV de 220 nm después de la purificación en columna de sílice y la liofilización.

La figura 19B ilustra los perfiles del cromatograma de CL/EM del compuesto 1: OTL78 a una longitud de onda UV de 490 nm después de la purificación en columna de sílice y la liofilización.

50 La figura 19C muestra los perfiles del cromatograma de CL/EM del compuesto 1: OTL78 a una longitud de onda UV de 550 nm después de la purificación en columna de sílice y la liofilización.

La figura 19D representa los perfiles del cromatograma de CL/EM del compuesto 1:OTL78 a una longitud de onda UV de 775 nm después de la purificación en columna de sílice y la liofilización.

La figura 20A ilustra los perfiles del cromatograma de UPLC con columna de HPLC del compuesto 1:OTL78 a una longitud de onda UV de 490 nm después de la purificación en columna de sílice y la liofilización.

- 5 La figura 20B muestra los perfiles del cromatograma de UPLC con columna de HPLC del compuesto 1:OTL78 a una longitud de onda UV de 550 nm después de la purificación en columna de sílice y la liofilización.

La figura 20C representa los perfiles del cromatograma de UPLC con columna de HPLC del compuesto 1: OTL78 a una longitud de onda UV de 775 nm después de la purificación en columna de sílice y la liofilización.

- 10 La figura 20D ilustra los perfiles del cromatograma de UPLC con columna de HPLC del compuesto 1:OTL78 a una longitud de onda UV de 265 nm después de la purificación en columna de sílice y la liofilización.

La figura 21A muestra los perfiles del cromatograma de CL/EM del compuesto 1 :OTL78 a una longitud de onda UV de 490 nm después de la purificación por HPLC.

La figura 21B representa los perfiles del cromatograma de CL/EM del compuesto 1: OTL78 a una longitud de onda UV de 550 nm después de la purificación por HPLC.

- 15 La figura 21C ilustra los perfiles del cromatograma de CL/EM del compuesto 1: OTL78 a una longitud de onda UV de 775 nm después de la purificación por HPLC.

La figura 22A muestra la vista ampliada de la figura 21A para el análisis de impurezas.

La figura 22B representa la vista ampliada de la figura 21B para el análisis de impurezas.

La figura 22C ilustra la vista ampliada de la figura 21C para el análisis de impurezas.

- 20 La figura 23A muestra los perfiles del cromatograma de UPLC con columna de HPLC del compuesto 1: OTL78 a una longitud de onda UV de 490 nm después de la purificación por HPLC.

La figura 23B representa los perfiles del cromatograma de UPLC con columna de HPLC del compuesto 1: OTL78 a una longitud de onda UV de 550 nm después de la purificación HPLC.

- 25 La figura 23C ilustra los perfiles del cromatograma de UPLC con columna de HPLC del compuesto 1: OTL78 a una longitud de onda UV de 775 nm después de la purificación por HPLC.

La figura 24A muestra la vista ampliada de la figura 23A.

La figura 24B representa la vista ampliada de la figura 23B.

La figura 24C ilustra la vista ampliada de la figura 23C.

- 30 La figura 25 muestra las fracciones de la columna de gel de sílice de la purificación del compuesto 1: OTL78 en bruto siguiendo las condiciones de CL/EM de la figura 4A.

Definiciones

Debe entenderse que esta invención no se limita a la metodología, los protocolos, las líneas celulares, los constructos y los reactivos particulares descritos en el presente documento y, como tal, puede variar.

- 35 Tal como se usan en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular “un”, “uno/a” y “el/la” incluyen las referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a un “ligando de antígeno prostático específico de membrana”, “ligando de PSMA”, es una referencia a uno o más de tales ligandos e incluye equivalentes de los mismos conocidos por los expertos en la técnica, etc.

- 40 A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que habitualmente entiende un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque cualquier método, dispositivo y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento puede usarse en la práctica o las pruebas de la invención, a continuación se describen los métodos, dispositivos y materiales preferidos.

- 45 Con respecto a los conjugados NIR dirigidos a PSMA dados a conocer en el presente documento, el término “antigénicamente específico” o “se une específicamente” se refiere a compuestos dirigidos a PSMA que se unen a uno o más epítomos de PSMA, pero que no reconocen sustancialmente ni se unen a otras moléculas en una muestra que contiene una población mixta de antígenos.

El término “epítomo”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un sitio en PSMA que es reconocido por

DUPA. Un epítipo puede ser una secuencia lineal o conformacionalmente formada o la forma de aminoácidos.

Tal como se usa en el presente documento, “compuesto que selecciona como diana PSMA” o “compuesto dirigido a PSMA” debe incluir aquellas moléculas pequeñas, ligandos, polipéptidos y proteínas que tienen al menos la actividad biológica de unión específica a PSMA o a un epítipo de PSMA. Estos compuestos incluyen ligandos, receptores, péptidos o cualquier secuencia de aminoácidos que se una a PSMA o al menos a un epítipo de PSMA.

Los compuestos dados a conocer en el presente documento comprenden un compuesto que selecciona como diana PSMA, pueden unirse a una porción del propio PSMA o pueden unirse a un receptor o a una proteína de la superficie celular que esté asociado con PSMA.

Los términos “grupo funcional”, “resto activo”, “grupo activador”, “grupo saliente”, “sitio reactivo”, “grupo químicamente reactivo” y “resto químicamente reactivo” se usan en la técnica y en el presente documento para referirse a porciones o unidades distintas y definibles de una molécula. Los términos son en cierto modo sinónimos en las técnicas químicas y se usan en el presente documento para indicar las porciones de las moléculas que realizan alguna función o actividad y son reactivas con otras moléculas.

El término “aminoácido” se refiere a los aminoácidos que se producen de manera natural y que no se producen de manera natural, así como a los análogos de aminoácidos y a los miméticos de aminoácidos que funcionan de manera similar a los aminoácidos que se producen de manera natural. Los aminoácidos codificados de manera natural son los 20 aminoácidos habituales (alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina) y pirolisina y selenocisteína. Los análogos de aminoácidos son compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido que se produce de manera natural, es decir, un carbono α unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, tales como homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina y metilsulfonio de metionina. Tales análogos tienen grupos R modificados (tales como norleucina) o estructuras principales peptídicas modificadas, pero conservan la misma estructura química básica que un aminoácido que se produce de manera natural.

En el presente documento, los aminoácidos pueden designarse o bien mediante sus símbolos de tres letras habitualmente conocidos o bien mediante los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de la IUPAC-IUB.

La presente divulgación aborda, entre otras cosas, los problemas asociados con el diagnóstico precoz y el tratamiento quirúrgico de células que expresan PSMA implicadas en enfermedades y/o cáncer, y en particular conjugados de colorantes dirigidos a PSMA con propiedades de diagnóstico por imagen, diagnósticas y biológicas mejoradas incluyendo, como ejemplos no limitativos, mayor especificidad, disminución de la señal de fondo y aumento de la fluorescencia tumoral.

Descripción detallada

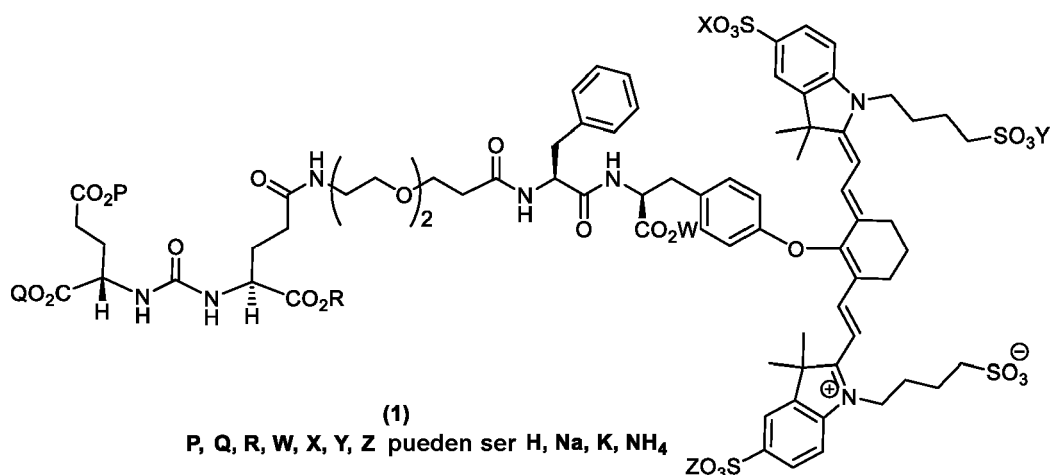
La cirugía cura al 50% de los pacientes con tumores sólidos en EE.UU., mientras que la quimioterapia y la radioterapia curan a menos del 5% de todos los pacientes con cáncer. Más de 700.000 pacientes se someten a cirugía oncológica cada año en EE.UU. y el 40% de los pacientes sometidos a cirugía presentan una recidiva de la enfermedad locorregional en un plazo de 5 años. A pesar de los grandes avances en el campo de la oncología, sigue existiendo la necesidad de una detección precoz, métodos para superar los obstáculos a la resección quirúrgica completa del tumor primario con márgenes negativos, y la eliminación de las células cancerosas metastásicas y la identificación de la enfermedad satélite. La consecución de estos tres objetivos no sólo mejora la eliminación de la enfermedad, sino que también orienta las decisiones relativas a la quimioterapia y la radioterapia postoperatorias. Aunque se ha demostrado que los colorantes fluorescentes no dirigidos se acumulan de forma pasiva en algunos tumores, las razones de tumor con respecto a fondo resultantes suelen ser deficientes y los límites entre los tejidos malignos y sanos pueden ser difíciles de definir. Aunque se han usado colorantes de fluorescencia dirigidos a ligandos (por ejemplo, EC17: folato-EDA-FITC) para obtener imágenes de un tejido, estos colorantes han resultado ineficaces, ya que no penetraban en el tejido profundo y, por tanto, sólo identificaban las células específicas de la superficie de un tejido en lugar de las más profundas dentro de la muestra de tejido. Además, los colorantes basados en fluoresceína tienen la desventaja de su baja estabilidad de tiempo de conservación. El puente de tiourea formado por los compuestos de isotiocianato de fluoresceína (FITC) se descompone con facilidad haciendo que el compuesto sea inestable. Además, EC17 usa fluoresceína que tiene el inconveniente de un nivel relativamente alto de ruido de fondo inespecífico procedente del colágeno de los tejidos que rodean el sitio de obtención de imágenes. Además, la absorción de luz visible por los cromóforos biológicos, en particular la hemoglobina, limita aún más la utilidad de los colorantes que incorporan fluoresceína. Por tanto, los colorantes convencionales no pueden detectar fácilmente tumores que pueden estar enterrados a más de unos pocos milímetros de profundidad en el tejido. Además, la fluorescencia de la fluoresceína se extingue a pH bajo (por debajo de pH 5).

Para que un material colorante sea útil para detectar y guiar la cirugía o proporcionar detección de imágenes tempranas, metastásicas y de otros tejidos, es importante superar estos inconvenientes. La presente invención

proporciona conjugados de colorantes infrarrojos cercanos dirigidos a PSMA que son estables, fluorescentes en el intervalo de infrarrojo, penetran profundamente en el tejido diana para producir una identificación específica y brillante de las áreas de tejido que expresan PSMA, una rápida eliminación a partir de los tejidos que no expresan PSMA para obtener una alta razón de tumor con respecto a fondo, y una eliminación rápida a partir de la piel. Más específicamente, los conjugados dirigidos a PSMA están unidos a los colorantes de infrarrojo cercano a través de un ligador que consiste en uno o más ligadores atómicos, aminoácidos, derivados de aminoácidos. Incluso más específicamente, se ha encontrado que, cuando el ligador atómico es ligador hidrófobo de 7 átomos con átomos neutros o cargados y el ligador aminoácido es aminoácido aromático o un derivado de aminoácido aromático, o aminoácido de carga negativa o positiva y tirosina o un derivado de tirosina. La carga del ligador puede variarse para obtener una rápida eliminación a partir de la piel y una rápida acumulación tumoral para obtener una mayor razón de tumor con respecto a fondo. Además, la intensidad de fluorescencia del colorante NIR se mantiene o incluso aumenta al tener el aminoácido aromático o la tirosina o un derivado de tirosina, y la carga del colorante NIR puede variarse para conseguir una rápida eliminación a partir de la piel.

Esta divulgación proporciona ligandos dirigidos a PSMA unidos a colorantes NIR y la invención proporciona métodos para sintetizar los mismos. Esta divulgación también proporciona compuestos para su uso en el diagnóstico por imagen dirigido de tumores que expresan PSMA, incluyendo pero no sin limitarse a cáncer de próstata, y métodos de uso, por ejemplo, en el diagnóstico por imagen que implica tejidos y tumores positivos para PSMA.

Se da a conocer un compuesto que tiene la fórmula:



Los compuestos de la presente divulgación tienen unos máximos de absorción y emisión comprendidos entre aproximadamente 500 nm y aproximadamente 900 nm, preferiblemente unos máximos de absorción y emisión comprendidos entre aproximadamente 600 nm y 800 nm.

En la divulgación, los compuestos se hacen fluorescentes después de su distribución en las células tisulares. En la divulgación, los compuestos se hacen fluorescentes sometiendo a una luz de excitación de longitud de onda infrarroja cercana. En la divulgación, los compuestos tienen una afinidad de unión por PSMA que es similar a la afinidad de unión de DUPA. En la divulgación, los compuestos son altamente selectivos para seleccionar como diana una célula tumoral.

Se divulgan métodos de diagnóstico por imagen óptica de tejido biológico que expresa PSMA, comprendiendo dicho método:

- (a) poner en contacto el tejido biológico con una composición que comprende un compuesto de colorante NIR dirigido a PSMA,
- (b) dejar tiempo para que el compuesto de la composición se distribuya en la diana biológica;
- (c) iluminar el tejido con una luz de excitación de una longitud de onda absorbible por el compuesto; y
- (d) detectar una señal óptica emitida por el compuesto.

Estos métodos se usan en la detección de enfermedades asociadas a una expresión alta de PSMA. El método puede comprender además la etapa de construir una imagen a partir de la señal emitida en (d). La etapa (a) puede incluir dos o más compuestos fluorescentes cuyas propiedades de señal sean distinguibles en contacto con el tejido, y opcionalmente el tejido está en un sujeto.

Las composiciones que comprenden que comprenden los compuestos mencionados anteriormente pueden usarse para tratar el cáncer. El cáncer puede seleccionarse del grupo que consiste en cáncer de próstata, cáncer de vejiga,

cáncer de páncreas, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, sarcoma, cáncer de mama, cáncer de cerebro, carcinoma neuroendocrino, cáncer de colon, cáncer testicular o melanoma. Los compuestos de colorante NIR dirigidos a PSMA dados a conocer en el presente documento pueden usarse para el diagnóstico por imagen de células que expresan PSMA. Las células pueden elegirse del grupo que consiste en células de próstata, células de

5 cáncer de próstata, células de cáncer de vejiga, células de cáncer de páncreas, células de cáncer de hígado, células de cáncer de pulmón, células de cáncer de riñón, células de sarcoma, células de cáncer de mama, células de cáncer de cerebro, células de carcinoma neuroendocrino, células de cáncer de colon, células de cáncer testicular o células de melanoma.

La presente divulgación también proporciona métodos para seleccionar como diana un tipo de célula en una muestra biológica que comprenden: a) poner en contacto la muestra biológica con un compuesto de colorante NIR dirigido a PSMA durante un tiempo y en condiciones que permitan la unión del compuesto a al menos una célula del tipo de célula diana; y b) detectar ópticamente la presencia o ausencia del compuesto en la muestra biológica, en el que la presencia del compuesto en la etapa de detección c) indica que el tipo de célula diana está presente en la muestra biológica. En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona métodos para la detección óptica de células que expresan PSMA que comprenden administrar compuestos de colorante NIR que seleccionan como diana PSMA y someter el compuesto a una fuente de luz de excitación y detectar la fluorescencia del compuesto. La fuente de luz de excitación puede ser luz de longitud de onda infrarroja cercana, preferiblemente dentro de un intervalo de desde aproximadamente 600 hasta 1000 nanómetros, más preferiblemente dentro de un intervalo de desde aproximadamente 670 hasta 850 nanómetros.

La longitud de onda de luz infrarroja puede estar dentro de un intervalo de desde aproximadamente 600 hasta 1000 nanómetros, preferiblemente dentro de un intervalo de desde aproximadamente 670 hasta 850 nanómetros.

Se da a conocer un kit que comprende un compuesto de colorante NIR que selecciona como diana PSMA. El kit puede usarse para el diagnóstico por imagen de células o tejidos que expresan PSMA. Las células que expresan PSMA pueden ser células tumorales. Las células que expresan PSMA pueden ser células cancerosas no prostáticas. Las células que expresan PSMA pueden ser células tumorales de próstata. Las células que expresan PSMA pueden ser células cancerosas. Los compuestos de colorante NIR dirigidos a PSMA dados a conocer en el presente documento tienen una razón de tumor con respecto a fondo mejorada.

La presente divulgación se refiere a compuestos dirigidos al antígeno prostático específico de membrana (PSMA) conjugados con colorantes de infrarrojo cercano (NIR). La divulgación describe además métodos y composiciones para preparar y usar los compuestos, métodos que incorporan los compuestos y kits que incorporan los compuestos. Se ha descubierto que un compuesto dirigido a PSMA, tal como DUPA o la conjugación de un ligando que selecciona como diana PSMA con un colorante NIR a través de un ligador (L), puede ser útil en la obtención de imágenes, el diagnóstico y/o el tratamiento del cáncer de próstata y enfermedades relacionadas que implican poblaciones celulares patógenas que expresan o sobreexpresan PSMA. PSMA es una proteína de la superficie celular que se internaliza en un proceso análogo a la endocitosis observada con receptores de la superficie celular, tales como los receptores de vitaminas. PSMA también se expresa en la neovascularización de la mayoría de los tumores sólidos. Por consiguiente, se ha descubierto que determinados conjugados que incluyen un ligador que tiene una longitud predeterminada, y/o un diámetro predeterminado, y/o grupos funcionales preseleccionados a lo largo de su longitud, pueden usarse para tratar, obtener imágenes y/o diagnosticar tales enfermedades.

En el presente documento se muestra que los conjugados de colorante NIR dirigidos a PSMA mencionados anteriormente se unen a las células tumorales que expresan PSMA dentro de un tejido. Además, la intensidad de la fluorescencia es mayor que la intensidad observada anteriormente con otros colorantes de infrarrojo cercano que se seleccionan como diana con folato para tumores positivos para receptores de folato. Esta intensidad aumentada permite el direccionamiento y la identificación clara de áreas más pequeñas de muestras biológicas (por ejemplo, tumores más pequeños) de un tejido que se está monitorizando. Además, la intensidad aumentada de los compuestos mencionados anteriormente proporciona la ventaja añadida de que pueden administrarse dosis/cantidades menores del colorante y todavía producir resultados significativos. Por tanto, los compuestos mencionados anteriormente conducen a técnicas de diagnóstico por imagen más económicas. Además, existe la ventaja añadida de que una dosis más baja de los compuestos mencionados anteriormente, en comparación con los compuestos de diagnóstico por imagen convencionales, minimiza la toxicidad y otros efectos secundarios asociados con la administración de materiales extraños a un cuerpo.

Además, la identificación de tumores pequeños conducirá a una resección más precisa y más eficaz del tumor primario para producir márgenes negativos, así como a la identificación y extirpación precisas de los ganglios linfáticos que albergan células cancerosas metastásicas y a la identificación de la enfermedad satélite. Cada una de estas ventajas se correlaciona positivamente con un mejor resultado clínico para el paciente que se trata.

Se contempla que, además de la tirosina y los derivados de tirosina, también puede ser útil un conjugado dirigido a PSMA de un colorante de infrarrojo cercano con cisteína o derivados de cisteína. Además, se contempla que un enlace directo del resto dirigido a PSMA con el colorante o un enlace del colorante con DUPA o un ligando dirigido a PSMA a través de un ligador de amina también produce una pérdida de intensidad de la fluorescencia del conjugado, mientras que la presencia de tirosina o derivado de tirosina como resto de unión entre medias potencia la

fluorescencia del compuesto conjugado como resultado del hecho de que los compuestos basados en tirosina de la invención no requieren un ligador de amino adicional para conjugar el SO456 y además porque la conjugación a través del resto de fenol de la tirosina conduce a una fluorescencia potenciada.

Los compuestos pueden usarse con sistemas de diagnóstico por imagen de tomografía molecular mediados por fluorescencia, tales como los diseñados para detectar la activación de fluorescencia en el infrarrojo cercano en tejidos profundos. Los compuestos proporcionan especificidad molecular y tisular, producen un alto contraste de fluorescencia, una señal de fluorescencia más brillante y reducen la autofluorescencia de fondo, lo que permite una mejor detección precoz y la evaluación de dianas moleculares de tejidos enfermos *in vivo* (por ejemplo, cánceres). Los compuestos pueden usarse para el diagnóstico por imagen tridimensional de tejidos profundos, cirugía dirigida y métodos para cuantificar la cantidad de un tipo de célula diana en una muestra biológica.

En algunos casos, el ligador tiene menos de diez átomos. En otras realizaciones, el ligador tiene menos de veinte átomos. En algunos casos, el ligador tiene menos de 30 átomos. En algunos casos, el ligador se define por el número de átomos que separan el compuesto que selecciona como diana PSMA y el colorante NIR. En otro caso, los ligadores tienen una longitud de cadena de al menos 7 átomos. En algunos casos, los ligadores tienen una longitud de cadena de al menos 14 átomos. En otro caso, los ligadores tienen una longitud de cadena comprendida entre 7 átomos y 20 átomos. En otro caso, los ligadores tienen una longitud de cadena en el intervalo de 14 átomos a 24 átomos.

Los compuestos que seleccionan como diana PSMA útiles pueden seleccionarse, por ejemplo, basándose en los siguientes criterios, que no pretende que sean exclusivos: unión a células vivas que expresan PSMA; unión a neovasculatura que expresa PSMA; alta afinidad de unión por PSMA; unión a un epítipo único en PSMA (para eliminar la posibilidad de que anticuerpos con actividades complementarias cuando se usan en combinación compitan por la unión al mismo epítipo); opsonización de células que expresan PSMA; mediación de la inhibición del crecimiento, fagocitosis y/o destrucción de células que expresan PSMA en presencia de células efectoras; modulación (inhibición o potenciación) de las actividades de NAALADasa, folato hidrolasa, dipeptidil peptidasa IV y/o γ -glutamil hidrolasa; inhibición del crecimiento, detención del ciclo celular y/o citotoxicidad en ausencia de células efectoras; internalización de PSMA; unión a un epítipo conformacional en PSMA; reactividad cruzada mínima con células o tejidos que no expresan PSMA; y unión preferente a formas diméricas de PSMA en lugar de formas monoméricas de PSMA.

Los compuestos que seleccionan como diana PSMA, los anticuerpos contra PSMA y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos proporcionados en el presente documento cumplen normalmente uno o más, y en algunos casos, más de cinco, de los criterios anteriores. En algunos casos, los compuestos que seleccionan como diana PSMA mencionados anteriormente cumplen seis o más de los criterios anteriores. En algunos casos, los compuestos que seleccionan como diana PSMA mencionados anteriormente cumplen siete o más de los criterios anteriores. En algunos casos, los compuestos que seleccionan como diana PSMA mencionados anteriormente cumplen ocho o más de los criterios anteriores. En algunos casos, los compuestos que seleccionan como diana PSMA mencionados anteriormente cumplen nueve o más de los criterios anteriores. En algunos casos, los compuestos que seleccionan como diana PSMA mencionados anteriormente cumplen diez o más de los criterios anteriores. En algunos casos, los compuestos que seleccionan como diana PSMA mencionados anteriormente cumplen todos los criterios anteriores.

Los ejemplos de tumores de los que pueden obtenerse imágenes con los compuestos dirigidos a PSMA mencionados anteriormente (por ejemplo, conjugados de colorante NIR dirigido a PSMA) incluyen cualquier tumor que exprese PSMA tal como, por ejemplo, próstata, vejiga, páncreas, pulmón, colon, riñón, melanomas y sarcomas. Un tumor que expresa PSMA incluye tumores con neovasculatura que expresa PSMA.

En algunos casos, las moléculas dirigidas a PSMA se unen a PSMA y se internalizan con PSMA expresado en las células. Por tanto, un conjugado de ligando de PSMA que comprende un PSMA internalizado se expresa en las células.

Los compuestos que seleccionan como diana PSMA pueden unirse a un epítipo conformacional dentro del dominio extracelular de la molécula de PSMA. Un compuesto que selecciona como diana PSMA puede unirse a un epítipo específico de dímero en PSMA. Generalmente, el compuesto que se une a un epítipo específico de dímero se une preferentemente al dímero de PSMA en lugar de al monómero de PSMA. El compuesto que selecciona como diana PSMA se une preferentemente al dímero de PSMA. El compuesto que selecciona como diana PSMA puede tener una baja afinidad por la proteína monomérica de PSMA.

En algunos casos, el compuesto que selecciona como diana PSMA es un ligando. En algunos casos, el compuesto que selecciona como diana PSMA es ácido 2-[3-(1,3-dicarboxipropil)ureido]pentanodioico (DUPA). En algunos casos, el compuesto que selecciona como diana PSMA es DUPA o un derivado de DUPA, ligando, inhibidor o agonista que se une a células vivas que expresan PSMA.

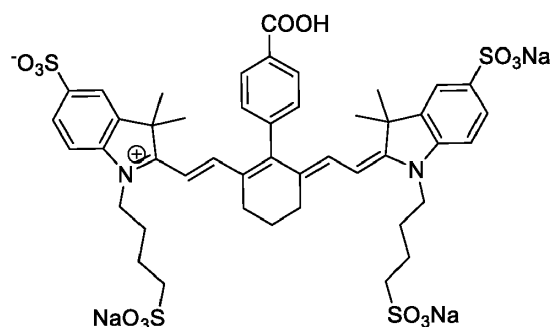
El colorante NIR que selecciona como diana PSMA de la presente divulgación produce una razón de tumor con respecto a señal de fondo que es más alta que la razón de tumor con respecto a señal de fondo del compuesto que

selecciona como diana PSMA conjugado con un colorante distinto de NIR o un colorante NIR no dirigido. En algunos casos, la mejora es de 10 veces. En algunos casos, la razón de tumor con respecto a señal de fondo es una mejora de al menos 4 veces. En algunos casos, la razón de tumor con respecto a fondo se aumenta al menos 1,5 veces. En algunos casos, la señal de fondo del colorante NIR dirigido a PSMA es la mitad de la señal de fondo del compuesto dirigido a PSMA conjugado con un colorante fluorescente reactivo a la luz de menos de 600 nm de longitud de onda. En algunos casos, los métodos que usan el colorante NIR dirigido a PSMA en células vivas producen una señal de fondo inferior a la mitad de la señal de fondo del compuesto dirigido a PSMA conjugado con un colorante fluorescente reactivo a la luz de menos de 600 nm de longitud de onda. En algunos casos, los métodos que usan el colorante NIR dirigido a PSMA en células vivas producen una señal de fondo inferior a la mitad de la señal de fondo del compuesto dirigido a PSMA conjugado con un colorante fluorescente reactivo a la luz de menos de 500 nm de longitud de onda. En algunos casos, los métodos que usan el colorante NIR dirigido a PSMA en células vivas producen una señal de fondo inferior a un tercio de la señal de fondo del compuesto dirigido a PSMA conjugado con un colorante fluorescente reactivo a la luz de menos de 600 nm de longitud de onda. En algunos casos, los métodos que usan el colorante NIR dirigido a PSMA en células vivas producen una señal de fondo inferior a un tercio de la señal de fondo del compuesto dirigido a PSMA conjugado con un colorante fluorescente reactivo a la luz de menos de 500 nm de longitud de onda. En algunos casos, los métodos que usan el colorante NIR dirigido a PSMA en células vivas producen una señal de fondo inferior a un cuarto de la señal de fondo del compuesto dirigido a PSMA conjugado con un colorante fluorescente reactivo a la luz de menos de 600 nm de longitud de onda. En algunos casos, los métodos que usan el colorante NIR dirigido a PSMA en células vivas producen una señal de fondo inferior a un cuarto de la señal de fondo del compuesto dirigido a PSMA conjugado con un colorante fluorescente reactivo a la luz de menos de 500 nm de longitud de onda. En algunos casos, los métodos que usan el colorante NIR dirigido a PSMA en células vivas producen una señal de fondo inferior a un quinto de la señal de fondo del compuesto dirigido a PSMA conjugado con un colorante fluorescente reactivo a la luz de menos de 600 nm de longitud de onda. En algunos casos, los métodos que usan el colorante NIR dirigido a PSMA en células vivas producen una señal de fondo inferior a un quinto de la señal de fondo del compuesto dirigido a PSMA conjugado con un colorante fluorescente reactivo a la luz de menos de 500 nm de longitud de onda. En algunos casos, los métodos que usan el colorante NIR dirigido a PSMA en células vivas producen una señal de fondo inferior a un octavo de la señal de fondo del compuesto dirigido a PSMA conjugado con un colorante fluorescente reactivo a la luz de menos de 600 nm de longitud de onda. En algunos casos, los métodos que usan el colorante NIR dirigido a PSMA en células vivas producen una señal de fondo inferior a un octavo de la señal de fondo del compuesto dirigido a PSMA conjugado con un colorante fluorescente reactivo a la luz de menos de 500 nm de longitud de onda. En algunos casos, los métodos que usan el colorante NIR dirigido a PSMA en células vivas producen una señal de fondo inferior a un décimo de la señal de fondo del compuesto dirigido a PSMA conjugado con un colorante fluorescente reactivo a la luz de menos de 600 nm de longitud de onda. En algunos casos, los métodos que usan el colorante NIR dirigido a PSMA en células vivas producen una señal de fondo inferior a un décimo de la señal de fondo del compuesto dirigido a PSMA conjugado con un colorante fluorescente reactivo a la luz de menos de 500 nm de longitud de onda.

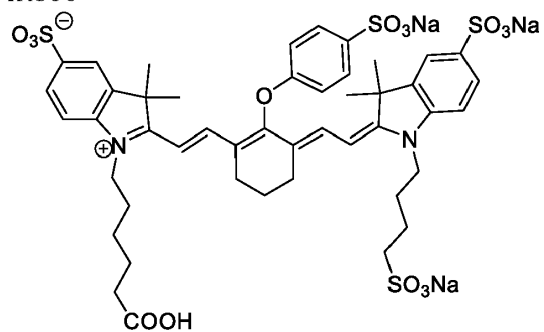
En algunos casos, el compuesto que selecciona como diana PSMA es un ligando de molécula pequeña que se une específicamente a PSMA. Tales ligandos de molécula pequeña pueden unirse al sitio enzimático de PSMA en su conformación nativa. Además, tales ligandos de molécula pequeña pueden poseer una cualquiera o más de las características de los ligandos de anticuerpos contra PSMA.

Esta divulgación también proporciona métodos para sintetizar grupos de unión de aminoácidos que se conjugan con un compuesto que selecciona como diana PSMA usado para el diagnóstico por imagen dirigido de células, tejidos o tumores que expresan PSMA. En determinados casos, esta divulgación se refiere a un compuesto o a un derivado de sal del mismo, que comprende un compuesto que selecciona como diana PSMA, un grupo de unión y un colorante NIR. En determinados casos, el grupo de unión puede ser un aminoácido, un isómero, un derivado o una mezcla racémica de los mismos. En algunos aspectos, el colorante se selecciona del grupo que consiste en

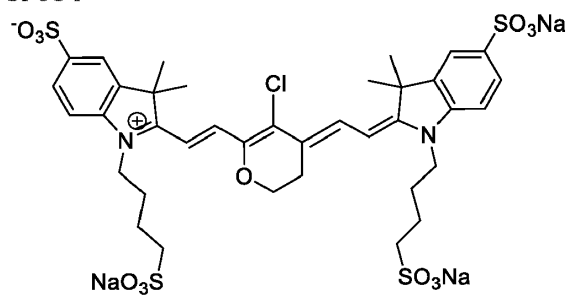
LS288



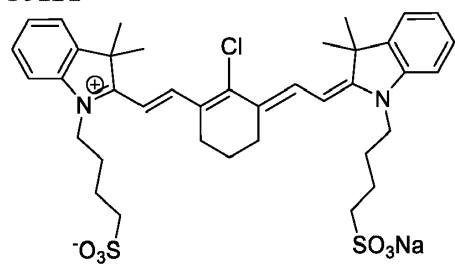
IR800



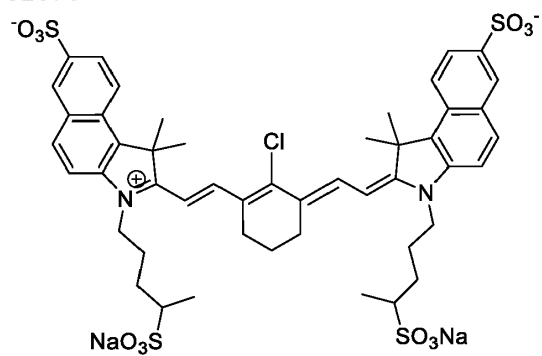
SP054



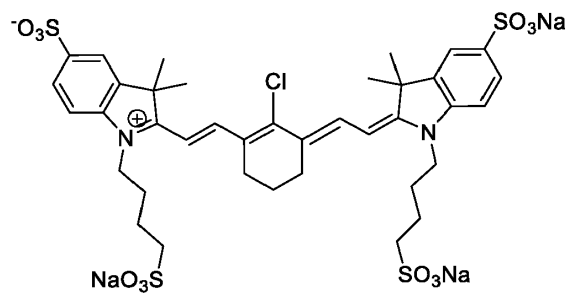
S0121



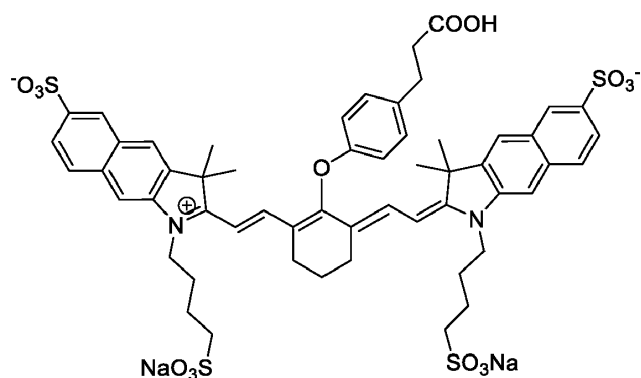
S2076



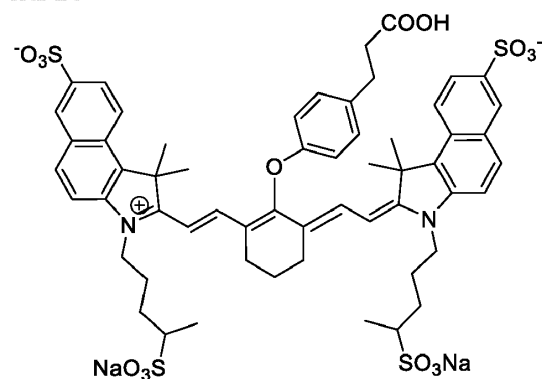
S0456



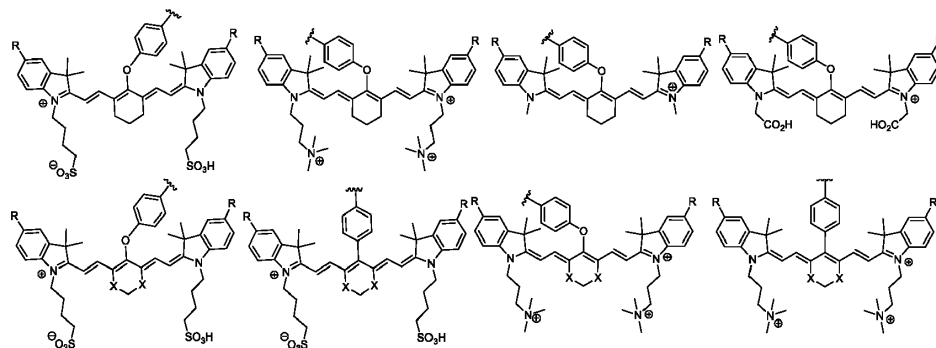
KODAK



IRD28



y/o los colorantes seleccionados del grupo que consiste en



5

R = H o R = SO₃H; X = O, S, N

10

15

20

En algunos aspectos, esta divulgación proporciona un método para conjugar un grupo de unión de aminoácidos a un colorante NIR, en el que el aminoácido puede ser tirosina, serina, treonina, lisina, arginina, asparagina, glutamina, cisteína, selenocisteína, isómeros y derivados de los mismos. En determinados casos, el aminoácido, los isómeros o los derivados de los mismos contienen un grupo funcional -OH, -NH₂ o -SH que, tras la adición del colorante fluorescente en un ligero exceso molar, produce la conjugación del grupo fluorescente con el aminoácido, el isómero o los derivados de los mismos. En otros casos, el aminoácido, los isómeros o los derivados de los mismos contienen un grupo funcional -OH que, tras la síntesis, genera un enlace éter con el colorante que aumenta el brillo y la detección del compuesto. En algunos casos, esta divulgación se refiere a la conjugación del grupo de unión de aminoácidos con el colorante NIR, en el que el aminoácido, los isómeros o los derivados de los mismos contienen un grupo funcional -SH, -SeH, -PoH o -TeH que, tras la síntesis, genera un enlace C-S, C-Se, C-Po o C-Te con el colorante. En algunos aspectos, esta divulgación se refiere a la conjugación del grupo de unión de aminoácidos con un colorante que tiene unos máximos de absorción y emisión comprendidos entre aproximadamente 500 nm y aproximadamente 900 nm. En otros aspectos, el grupo de unión de aminoácidos se conjuga con un colorante fluorescente que tiene unos máximos de absorción y emisión comprendidos entre aproximadamente 600 nm y aproximadamente 800 nm.

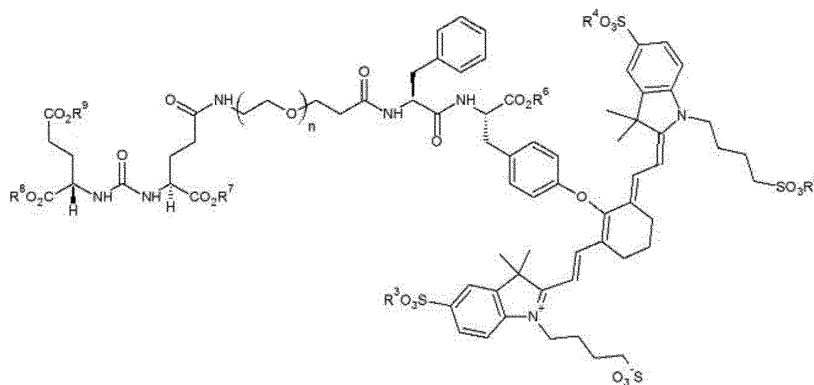
En casos adicionales, esta divulgación proporciona un método para conjugar el grupo de unión de aminoácidos con un ligando de PSMA, en el que el grupo de unión de aminoácidos es tirosina, serina, treonina, lisina, arginina, asparagina, glutamina, cisteína, selenocisteína, isómeros o derivados de los mismos, y se conjuga con folato a

través de un enlace dipeptídico. En aspectos adicionales, esta divulgación proporciona un método para conjugar el grupo de unión con un ligando de folato, en el que el grupo de unión es tirosina, serina, treonina, lisina, arginina, asparagina, glutamina, cisteína, selenocisteína, isómeros o derivados de los mismos. En otros casos, esta divulgación se refiere a un método para conjugar un ligando de pteróilo con un grupo de unión de aminoácidos, en el que el grupo de unión es tirosina, serina, treonina, lisina, arginina, asparagina, glutamina, cisteína, selenocisteína, isómeros o derivados de los mismos. En determinados aspectos, el ácido carboxílico del grupo de unión se une al carbono alfa de cualquier aminoácido, lo que aumenta la especificidad del compuesto para los receptores seleccionados como diana. En algunos casos, la carga del ligador contribuye a la especificidad del compuesto, en el que la afinidad de unión observada del compuesto por los receptores seleccionados como diana es de al menos 15 nM.

En otros casos, esta divulgación se refiere al uso de un compuesto denominado DUPA-EAOA-Tyr-S0456, en el que EAOA es ácido 8-aminooctonoico, para cirugía guiada por imágenes, diagnóstico por imagen de tumores, diagnóstico por imagen de la próstata, diagnóstico por imagen de tejidos que expresan PSMA, diagnóstico por imagen de tumores que expresan PSMA, enfermedades infecciosas o aplicaciones forenses. En otros aspectos, el compuesto es un derivado de DUPA-EAOA-Tyr-S0456 seleccionado del grupo que consiste en DUPA-EAOA-(D)Tyr-S0456, DUPA-EAOA-homoTyr-S0456, DUPA-EAOA-beta-homo-Tyr-S0456, DUPA-EAOA-(NMe)-Tyr-S0456, DUPA-EAOA-Tyr(OMe)-S0456, DUPA-EAOA-Tyr(OBn)-S0456, DUPA-EAOA-NHNH-Tyr-OAc-S0456, sales y derivados de los mismos.

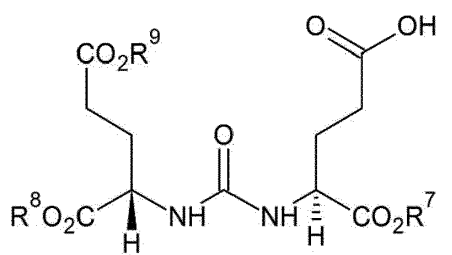
En algunos casos, el compuesto dirigido a PSMA es un ligando de molécula pequeña de PSMA.

La invención se refiere a un método para sintetizar un compuesto de fórmula:

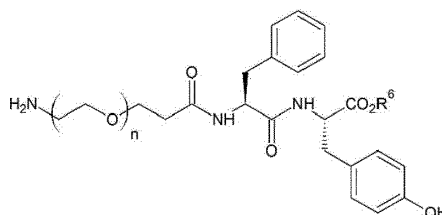


en la que n es 0, 1, 2, 3 o 4; además en la que R^3 , R^4 y R^5 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H^+ , Na^+ , K^+ y NH_4^+ , R^6 , R^7 , R^8 y R^9 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H^+ , Na^+ , K^+ y NH_4^+ y R^{10} es H^+ , que comprende las etapas de:

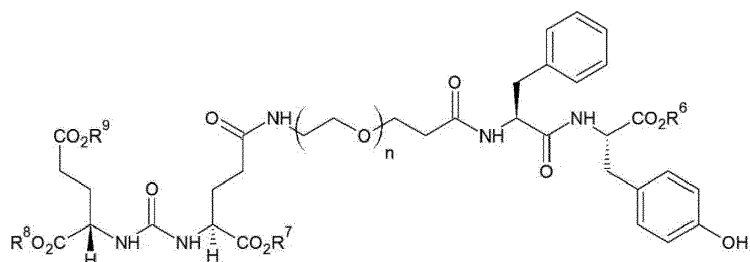
(a) hacer reaccionar un compuesto de fórmula I:



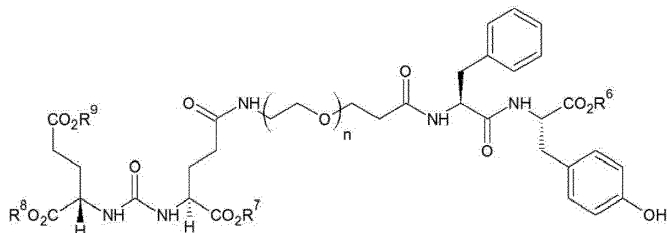
con un compuesto de fórmula:



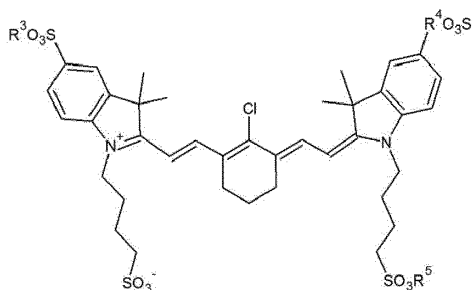
en presencia de un disolvente orgánico polar, hexafluorofosfato de 3-óxido de 1-[bis(dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio y N,N-diisopropiletilamina bajo argón para proporcionar un compuesto de fórmula:



(b) hacer reaccionar el compuesto de fórmula:

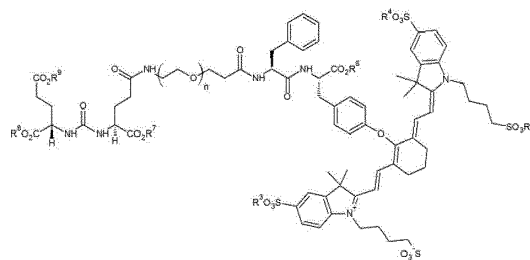


con carbonato de sodio y un compuesto de colorante de fórmula:



5

(c) aislar el compuesto de fórmula:

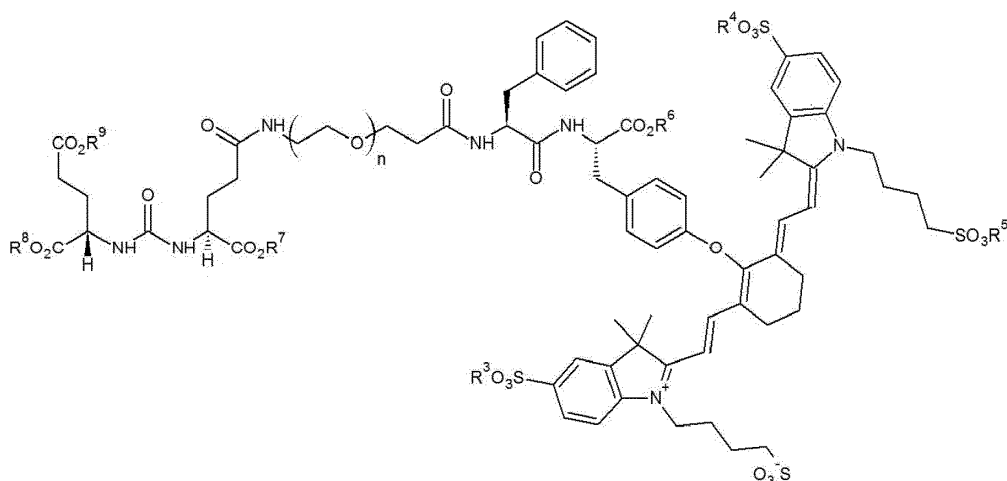


en las que n es 0, 1, 2, 3 o 4, y

en las que R³, R⁴ y R⁵ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H⁺, Na⁺, K⁺ y NH₄⁺, R⁶, R⁷, R⁸ y R⁹ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H⁺, Na⁺, K⁺ y NH₄⁺ y R¹⁰ es H⁺.

10

La invención también se refiere a un método para sintetizar una forma isotópica de un compuesto de fórmula:

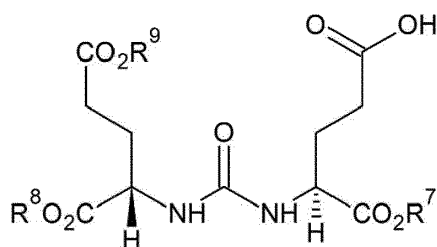


en la que dicha forma isotópica comprende uno o más carbonos y/o hidrógenos

además, en la que n es 0, 1, 2, 3 o 4; además, en la que R³, R⁴ y R⁵ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H⁺, Na⁺, K⁺ y NH₄⁺, R⁶, R⁷, R⁸ y R⁹ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H⁺, Na⁺, K⁺ y NH₄⁺ y R¹⁰ es H⁺; que comprende las etapas de:

5

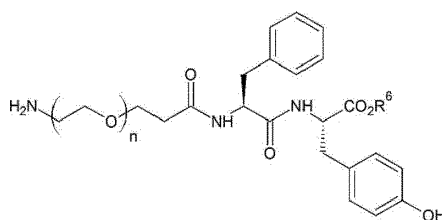
(a) hacer reaccionar una forma isotópica de un compuesto de fórmula:



en la que dicha forma isotópica comprende uno o más isótopos de carbono y/o hidrógeno seleccionados del grupo que consiste en H², H³, C¹³ y C¹⁴,

10

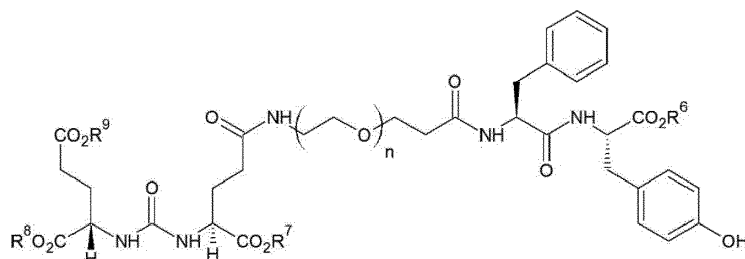
con una forma isotópica de un compuesto de fórmula:



en la que dicha forma isotópica comprende uno o más isótopos de carbono y/o hidrógeno seleccionados del grupo que consiste en H², H³, C¹³ y C¹⁴,

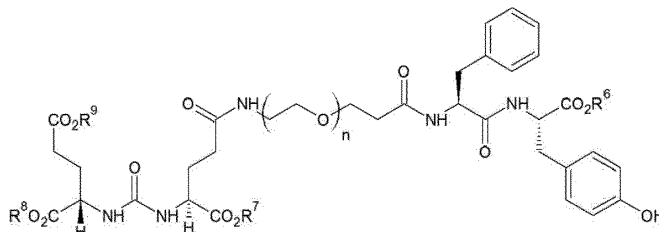
en presencia de un disolvente orgánico polar, hexafluorofosfato de 3-óxido de 1-[bis(dimetilamino)metilén]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio y N,N-diisopropiletilamina bajo argón para proporcionar una forma isotópica de un compuesto de fórmula:

15

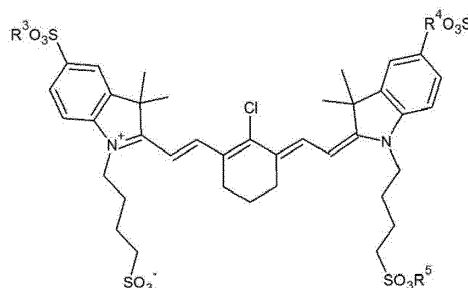


en la que dicha forma isotópica comprende uno o más isótopos de carbono y/o hidrógeno seleccionados del grupo que consiste en H^2 , H^3 , C^{13} y C^{14} ,

(b) hacer reaccionar la forma isotópica del compuesto de fórmula:

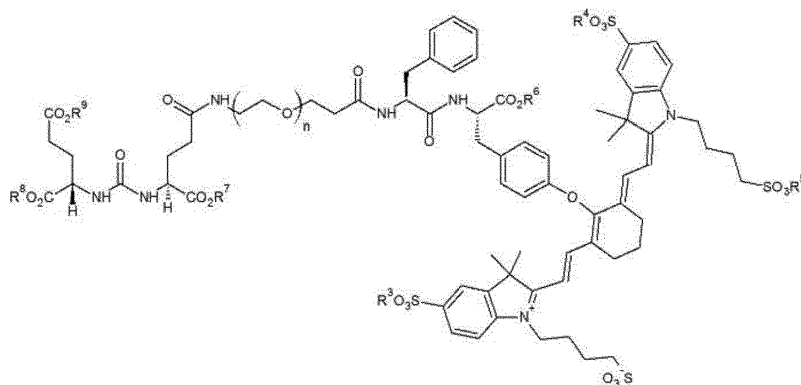


5 con carbonato de sodio y una forma isotópica de un compuesto de colorante de fórmula:



en la que dicha forma isotópica comprende uno o más isótopos de carbono y/o hidrógeno seleccionados del grupo que consiste en H^2 , H^3 , C^{13} y C^{14} ,

(c) aislar la forma isotópica del compuesto de fórmula:



10

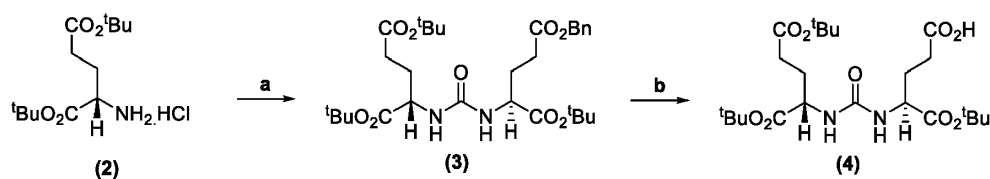
en la que dicha forma isotópica comprende uno o más isótopos de carbono y/o hidrógeno seleccionados del grupo que consiste en H^2 , H^3 , C^{13} y C^{14}

además, en las que n es 0, 1, 2, 3 o 4;

15 además, en las que R^3 , R^4 y R^5 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H^+ , Na^+ , K^+ y NH_4^+ , R^6 , R^7 , R^8 y R^9 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H^+ , Na^+ , K^+ y NH_4^+ y R^{10} es H^+ .

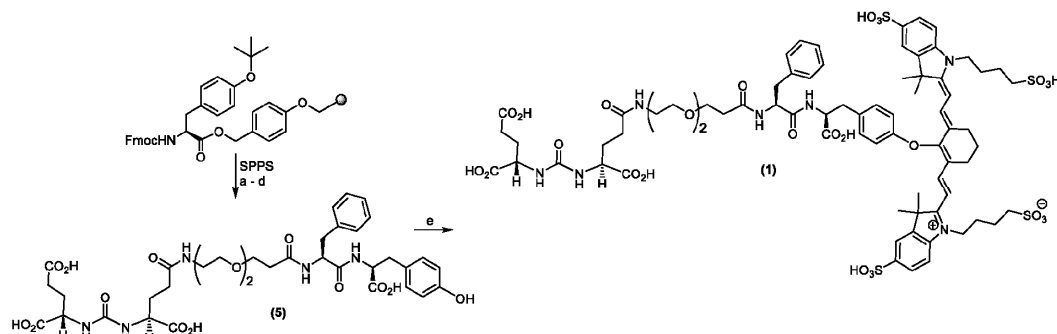
Conjugados de colorantes NIR dirigidos a PSMA y su síntesis

Los siguientes esquemas muestran la síntesis de conjugados de colorantes NIR dirigidos a PSMA de la presente divulgación.



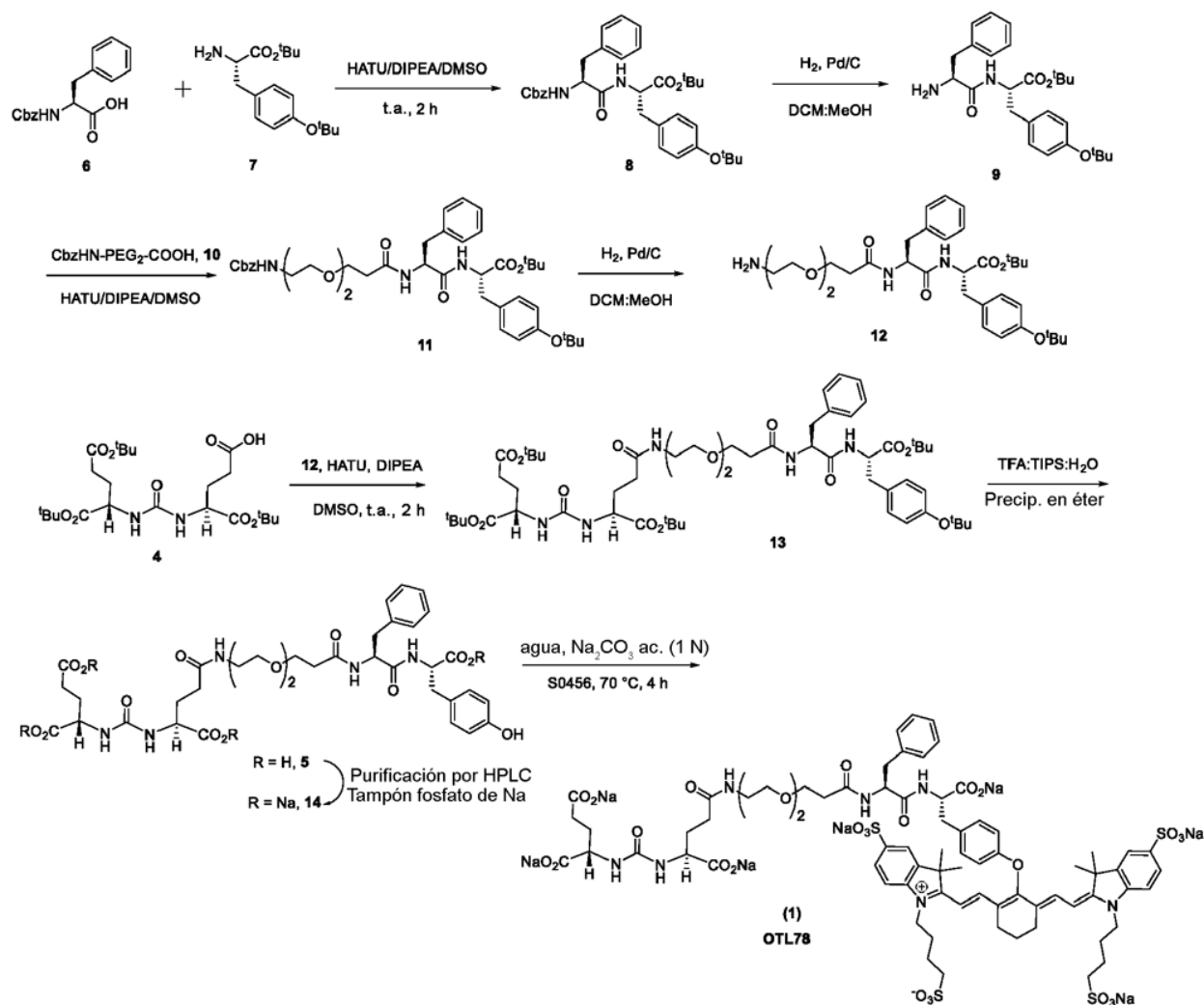
Esquema 1: Reactivos y condiciones: (a) (i) trifosgeno, TEA/DCM, -78°C ; (ii) H-L-Glu(OBn)-O^tBu · HCl; (b) H₂, Pd/C/DCM

(a) Síntesis en fase sólida



5 Esquema 2: Reactivos y condiciones: (a) (i) piperidina al 20%/DMF, t.a., 10 min; (ii) Fmoc-Phe-OH, HATU, DMF/DIPEA, 2 h; (b) (i) piperidina al 20%/DMF, t.a., 10 min; (ii) Fmoc-ácido 8-aminooctanoico-OH, HATU, DMF/DIPEA, 2 h; (c) (i) piperidina al 20%/DMF, t.a., 10 min, (ii) 4, HATU, DMF/DIPEA, 2 h; d) TFA:H₂O:TIPS (95:2,5:2,5), 1 h; (e) H₂O, NaOH ac. / pH = 9,5, t.a.; (ii) S0456, H₂O, 100 $^{\circ}\text{C}$, 15 min.

(b) Síntesis en fase de disolución



Ejemplos

Métodos generales: se cultivaron células 22Rv1 (células de cáncer de próstata humano) en monocapa usando un

medio RPMI (Gibco, NY) con suero bovino fetal inactivado por calor al 10% (Atlanta Biological, GA) y penicilina/estreptomicina al 1% (Gibco, NY) en una atmósfera humidificada con un 5% de dióxido de carbono y un 95% de aire a 37°C durante al menos seis pases antes de que se usaran para los ensayos.

Los ratones atímicos desnudos (nu/nu) macho (7 semanas de edad, 18 - 20 g) se adquirieron de Envigo (Indianápolis, IN) y se mantuvieron con una dieta normal para roedores (Teklad, WI). Los animales se alojaron 5 por jaula en un estante envuelto de barrera libre de patógenos. Se les suministró agua del grifo esterilizada en autoclave y pienso según sus necesidades. Los animales se alojaron en un entorno estéril con un ciclo convencional de luz-oscuridad de 12 horas durante todo el estudio. Los ratones se identificaron individualmente por punción auricular. Todos los procedimientos con animales fueron aprobados por el Comité de Cuidado y Uso de Animales de Purdue. El cuidado de los animales y los estudios se realizaron según las directrices nacionales e internacionales para el trato humanitario de los animales.

Unión y especificidad *in vitro*: se sembraron células 22Rv1 en un matraz T75 y se dejó que formaran una monocapa durante 24 h. Después de la digestión con tripsina, las células liberadas se transfirieron a tubos de centrifuga (1×10^6 células/tubo) y se centrifugaron. El medio se sustituyó por medio nuevo que contenía una concentración creciente del compuesto de colorante 1:OTL78 requerido en presencia o ausencia de un exceso de 100 veces del ligando, un inhibidor de PSMA de alta afinidad, y se incubó durante 1 h a 37°C. Después de enjuagar con medio nuevo ($2 \times 1,0$ ml) y PBS ($1 \times 1,0$ ml), las células se resuspendieron en PBS (1,0 ml) y se analizó la fluorescencia de unión celular (100.000 células/muestra) usando un fluorómetro (Cary, Agilent). Las afinidades de unión relativas se calcularon mediante un gráfico del % de fluorescencia de unión celular frente a la concentración logarítmica del artículo de prueba usando GraphPad Prism 4.

Diagnóstico por imagen de cuerpo entero: se inocularon por vía subcutánea células 22Rv1 ($5,0 \times 10^6$ /ratón en Matrigel de alta concentración al 50% en medio RPMI) en el hombro de ratones nu/nu macho de siete semanas de edad. El crecimiento de los tumores se midió en direcciones perpendiculares cada 2 días usando un compás calibrador (los pesos corporales se controlaron con el mismo programa), y los volúmenes de los tumores se calcularon como $0,5 \times L \times W^2$ (L = eje más largo y W = eje perpendicular a L en milímetros). Una vez que los tumores alcanzaron un volumen de entre 400 mm³, se inyectó por vía intravenosa a los animales (5 ratones/grupo) 10 nmol de 1: OTL78 requerido en solución salina tamponada con fosfato (100 µl). Para los estudios de biodistribución y diagnóstico por imagen de cuerpo entero, los animales se sacrificaron por asfixia con CO₂ 2 horas después de la administración del compuesto de interés.

A continuación, se realizaron experimentos de diagnóstico por imagen de cuerpo entero (tumor intacto) usando una estación de diagnóstico por imagen Caliper IVIS Lumina II con el software Living Image 4.0 (PerkinElmer Inc, MA).

Ajustes para el diagnóstico por imagen: nivel de la lámpara: medio; excitación: 745 nm; emisión: ICG (830 nm); iluminación epi; agrupamiento: 4 (M), FOV = 12,5; parada f = 2; tiempo de adquisición = 1 s. Para los estudios dependientes del tiempo, se tomaron imágenes de los animales bajo anestesia usando isoflurano. A continuación, se realizaron experimentos de diagnóstico por imagen de cuerpo entero (tumor intacto) usando una estación de diagnóstico por imagen Caliper IVIS Lumina II con el software Living Image 4.0 (PerkinElmer Inc, MA).

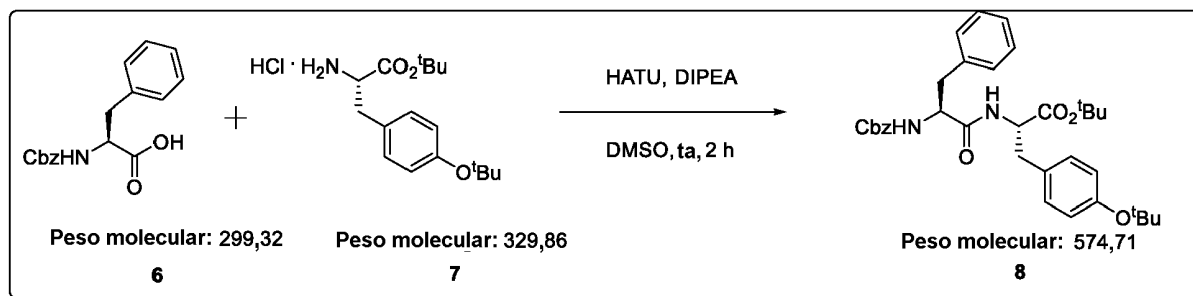
Biodistribución tisular: tras el diagnóstico por imagen de cuerpo entero, los animales se diseccionaron y los tejidos seleccionados (corazón, pulmón, hígado, bazo, riñones, estómago, intestino delgado, intestino grueso, músculo, piel y tumor) se analizaron para determinar la actividad de fluorescencia usando el generador de imágenes IVIS tal como antes. Ajustes para el diagnóstico por imagen: nivel de la lámpara: medio; excitación: 745 nm; emisión: ICG; iluminación epi; agrupamiento: 4 (M), FOV = 12,5; parada f = 2; tiempo de adquisición = 1 s.

Ejemplo (1): evaluación preclínica de conjugados de colorante NIR dirigidos a PSMA con variación aleatoria de la longitud del ligador/espaciador entre el ligando y el colorante NIR

Conclusión: el compuesto 1: OTL78 se excita a 776 nm y emite a 796 nm (figura 1), lo que demuestra un desplazamiento de Stokes de 20 nm con excelentes propiedades NIR. Se calculó que la constante de disociación (K_D) de 5 derivados de los estudios era de 1 nM (figura 2), lo que indica una afinidad muy alta por PSMA. El diagnóstico por imagen de cuerpo entero con ratones que portan xenoinjertos tumorales 22Rv1 (figura 3) y su biodistribución tisular *ex vivo* (figura 4) indicaron que el compuesto 1: OTL78 se absorbió únicamente en tumores positivos para PSMA sin acumulación en otros tejidos, lo que demuestra una razón de tumor con respecto a fondo muy alta. Tal como se observa en la figura 5 a y b, OTL78 no se acumuló en tumores de próstata PC3 negativos para PSMA, lo que demuestra una especificidad muy alta para PSMA. Los estudios de diagnóstico por imagen de cuerpo entero dependientes del tiempo (figura 6) demostraron que OTL78 se saturó en los tumores positivos para PSMA en el plazo de 2 horas y permaneció en el tumor durante 24 h.

Ejemplo (2): síntesis general de DUPA_PEG2_Phe_Tyr-S0456 (1: OTL78)

Etapa I:



Reactivos para la etapa I:

Productos químicos	P.M. (g/mol)	Densidad (g/ml)	Equiv.	Cant. (g)	Cant. (ml)	mmol
(L)-CbzNH-Phe-OH (6)	299,33		1,0	1,00 g		3,34
(L)-NH ₂ -Tyr(-O ^t Bu)-O ^t Bu·HCl (7)	329,87		1,05	1,156 g		3,51
HATU	380,24		1,05	1,334 g		3,51
DIPEA	129,24	0,742	2,5		1,454 ml	8,35
DMSO			0,33 M		10 ml	

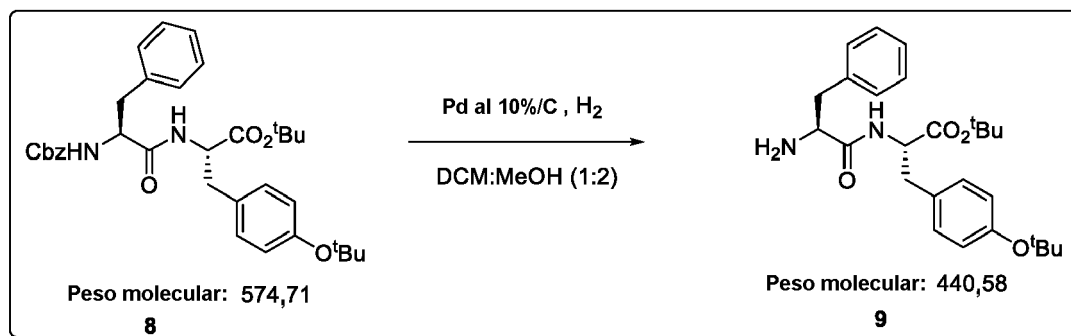
Se cargó un matraz de fondo redondo de 50 ml con una barra agitadora, (L) - fenilalanina con un grupo protector carboxibencilo (Cbz) en la amina ((L)-CbzNH-Phe-OH [(6), 1,0 g, 3,34 mmol, 1 equiv.]), ((L) - tirosina con grupos protectores terc-butilo en el grupo carboxilo y el oxígeno del fenilo ((L)-NH₂-Tyr(-O^tBu)-O^tBu·HCl [(7), 1,156 g, 3,51 mmol, 1,05 equiv.]) y HATU (1,334 g, 3,51 mmol, 1,05 equiv.). Luego se añadió DMSO (10 ml) al matraz de fondo redondo para dar una suspensión [suspensión I-A]. HATU es hexafluorofosfato de 3-óxido de 1-[bis(dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio. DIPEA es N,N-diisopropiletilamina. DMSO es dimetilsulfóxido. Se añadió lentamente DIPEA (1,454 ml, 8,35 mmol, 2,5 equiv.) a la suspensión I-A a 23°C durante 5 minutos para formar una disolución transparente. La mezcla de reacción se agitó a 23°C durante 2 h. El avance de la reacción se monitorizó mediante CL/EM. La mezcla de reacción se añadió gota a gota a una disolución con agitación de 60 ml de ácido cítrico al 5%-NaCl 1 N fría (preparada añadiendo 5,85 g de NaCl a 100 ml de disolución de ácido cítrico al 5%) para dar un precipitado del compuesto 8 en bruto ((CbzNH-(L)Phe-NH-(L)Tyr(-O^tBu)-O^tBu)·HCl. El precipitado se filtró y se disolvió en EtOAc (75 ml). La fase de EtOAc se lavó con agua (25 ml) seguido de salmuera (25 ml) y se secó sobre Na₂SO₄ anhidro. La fase de EtOAc seca se filtró y se concentró a vacío. El compuesto 8 en bruto se analizó mediante CL/EM (figuras 7a - 7d) y se usó para la siguiente etapa sin purificación adicional. El compuesto 8 en bruto se aisló con un rendimiento del 95%.

Método de CL/EM para el compuesto 8 en bruto: instrumento: Acquity UPLC, columna Waters: BEH C18, 1,7 µm, 2,1 × 50 mm. El 95% - 5% - 95% de acetato de amonio en eluyente acuoso 20 mM con el 5% - 95% - 5% de acetonitrilo en 7 minutos siguiendo el programa de gradiente que se muestra en la tabla 1. La velocidad de flujo es de 0,35 ml/min. El detector se selecciona del grupo que consiste en un detector UV de 220 nm (figura 7a), un detector UV de 263 nm (figura 7b), una matriz de diodos (figura 7c).

Tabla 1: eluyente A: acetato de amonio (NH₄OAc) ac. 20 mM; eluyente B: acetonitrilo (ACN).

Tiempo	Velocidad de flujo ml/min	% de A	% de B
0	0,35	95	5
2,2	0,35	25	75
2,8	0,35	5	95
4,0	0,35	5	95
4,6	0,35	95	5
7	0,35	95	5
7,01	0	95	5

Etapa II: desprotección de carboxibencilo (Cbz)



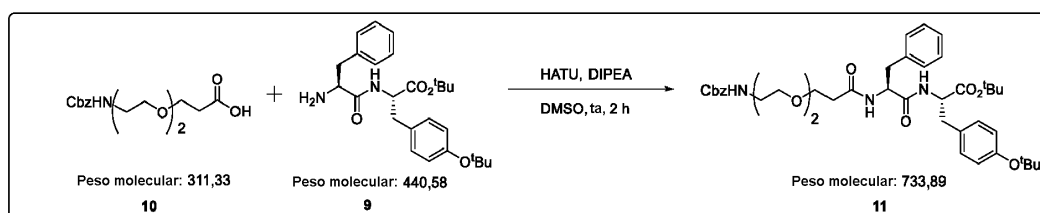
Reactivos para la etapa II:

Productos químicos	P.M. (g/mol)	Densidad (g/ml)	Equiv.	Cant. (g)	Cant. (ml)	mmol
CbzNH-Phe-Tyr-(O ^t Bu)-O ^t Bu (8)	574,71		1,0	1,50 g		2,61
Pd/C	Base de Pd al 10%		20% p/p	0,300 g		
DCM:MeOH (1:2)			0,1 M		27 ml (9 ml:18 ml)	

Se cargó un matraz de fondo redondo de 50 ml con una barra agitadora, CbzNH-Phe-Tyr-(O^tBu)-O^tBu [(8), 1,5 g, 2,61 mmol] y DCM (9 ml). Después de disolver la mezcla de reacción, se añadió en porciones al matraz de fondo redondo Pd/C (base de Pd al 10%, 20% p/p, 300 mg) seguido de MeOH anhidro (18 ml). La mezcla de reacción se desgasificó tres veces y se burbujeó gas de H₂ a través de la mezcla de reacción durante 3 horas con agitación a temperatura ambiente.

El método de CL/EM para el compuesto 9 en bruto es el mismo que el método de CL/EM para el compuesto 8 en bruto. El detector se selecciona del grupo que consiste en un detector UV de 220 nm (figura 8a), un detector UV de 263 nm (figura 8b), una matriz de diodos (figura 8c) y un espectrómetro de masas (figura 8d).

La mezcla de reacción se filtró a través de un lecho de Celite, se lavó con metanol (MeOH) y el filtrado se concentró a vacío para producir el compuesto 9 en bruto. El compuesto 9 en bruto se analizó mediante CL/EM y se usó para la siguiente etapa sin purificación adicional. El compuesto 9 se aisló con un rendimiento del 92%. El método de CL/EM después de la purificación del compuesto 9 es el mismo que el método de CL/EM para el compuesto 9 en bruto. El detector se selecciona del grupo que consiste en un detector UV de 220 nm (figura 9a), un detector UV de 263 nm (figura 9b), una matriz de diodos (figura 9c) y un espectrómetro de masas (figura 9d).

Etapa III: adición de PEG₂

Reactivos para la etapa III:

Productos químicos	P.M. (g/mol)	Densidad (g/ml)	Equiv.	Cant. (g)	Cant. (ml)	mmol
CbzNH-PEG ₂ -CO ₂ H (10)	311,33		1,0	3,10 g		9,96
NH ₂ -Phe-Tyr(O ^t Bu)-O ^t Bu (9)	440,58		1,0	4,39 g		9,96
HATU	380,24		1,05	4,0 g		10,46

DIPEA	129,24	0,742	2,0		3,48 ml	19,92
DMSO			0,33 M		20 ml	

Se cargó un matraz de fondo redondo de 50 ml con una barra agitadora, reactivo de polietilenglicol con un grupo protector carboxibencilo (Cbz) en la amina (Cbz-NH-PEG2-CO₂H [(10) 3,10 g, 9,96 mmol, 1 equiv.), NH₂-Phe-Tyr(OtBu)-OtBu (9, 4,39 g, 9,96 mmol, 1,0 equiv.) y HATU (4,0 g, 10,46 mmol, 1,05 equiv.). Luego se añadió DMSO (20 ml) al matraz de fondo redondo bajo argón y se agitó para disolver.

- 5 Se añadió lentamente DIPEA (3,48 ml, 19,92 mmol, 2,0 equiv.) a la mezcla de reacción a 23°C, durante 5 minutos. La reacción se agitó a 23°C durante 2 h y el avance de la reacción se monitorizó mediante CL/EM. El detector se selecciona del grupo que consiste en un detector UV de 220 nm (figura 10a), un detector UV de 263 nm (figura 10b), una matriz de diodos (figura 10c) y un espectrómetro de masas (figura 10d).

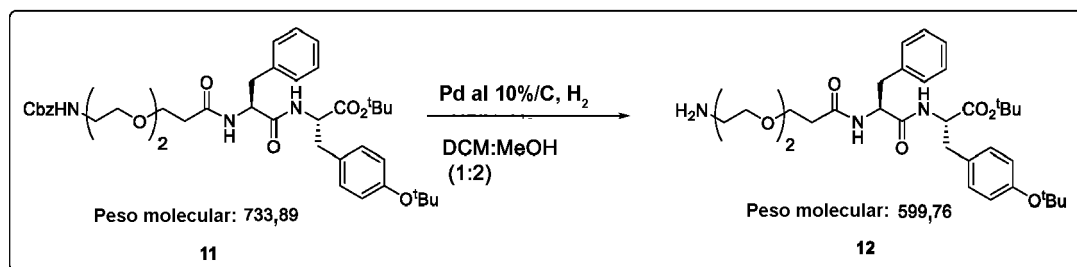
- 10 La mezcla de reacción se añadió gota a gota a una disolución con agitación de 120 ml de ácido cítrico al 5%-NaCl 1 N fría (preparada añadiendo 58,5 g de NaCl a 1000 ml de disolución de ácido cítrico al 5%) para precipitar como un sólido gomoso.

Se filtró el residuo gomoso después de decantar el agua y se disolvió en EtOAc (150 ml). La fase de EtOAc se lavó con agua (100 ml), seguido de salmuera (100 ml) y luego se secó sobre Na₂SO₄ anhidro. La fase de EtOAc seca se filtró y se concentró a vacío.

- 15 El producto en bruto se purificó usando una columna de gel de sílice usando DCM:EtOAc como fase móvil. El producto se eluyó entre el 20 y el 40% de EtOAc en DCM. Las fracciones puras combinadas se concentraron a vacío y se usaron en la siguiente etapa (métodos de cristalización para evitar la cromatografía en columna de gel de sílice en curso).

- 20 El compuesto 11 purificado se aisló con un rendimiento del 86% (optimización de la reacción en curso para mejorar el rendimiento). El método de CL/EM después de la purificación del compuesto 11 es el mismo que el método de CL/EM para el compuesto 9 en bruto. El detector se selecciona del grupo que consiste en un detector UV de 220 nm (figura 11a), un detector UV de 263 nm (figura 11b), una matriz de diodos (figura 11c) y un espectrómetro de masas (figura 11d).

Etapla IV: desprotección de carboxibencilo (Cbz)



- 25 Reactivos para la etapa IV:

Productos químicos	P.M. (g/mol)	Densidad (g/ml)	Equiv.	Cant. (g)	Cant. (ml)	mmol
CbzNH-PEG ₂ -Phe-Tyr(OtBu)-OtBu (11)	733,89		1,0	0,80 g		1,09
Pd/C	Base de Pd al 10%		10% p/p	0,08 g		
DCM:MeOH (1:2)			0,1 M		10 ml	

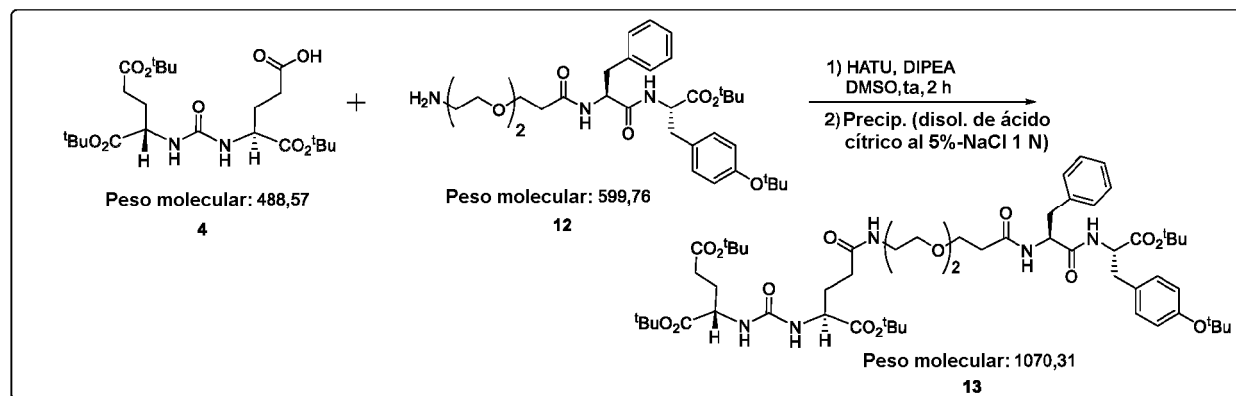
- 30 Se cargó un matraz de fondo redondo de 50 ml con una barra agitadora, CbzNH-PEG₂-Phe-Tyr(OtBu)-OtBu [(11), 0,80 g, 1,09 mmol] y DCM (3 ml). Después de disolver la mezcla de reacción, se añadió en porciones Pd/C (10% p/p, 0,08 g) seguido de metanol anhidro (7 ml). La mezcla de reacción se desgasificó tres veces y se burbujeó hidrógeno a través de la mezcla de reacción durante 3 horas con agitación a temperatura ambiente. El avance de la reacción se monitorizó mediante CL/EM. El detector se selecciona del grupo que consiste en un detector UV de 220 nm (figura 12a), un detector UV de 263 nm (figura 12b), una matriz de diodos (figura 12c) y un espectrómetro de masas (figura 12d).

La mezcla de reacción se filtró a través de un lecho de Celite, se lavó con MeOH y se concentró a vacío para producir el compuesto 12.

El producto en bruto se usó para la siguiente etapa sin purificación adicional.

El compuesto 12 se aisló con rendimiento cuantitativo.

5 Etapa V: adición de DUPA



Reactivos para la etapa V:

Productos químicos	P.M. (g/mol)	Densidad (g/ml)	Equiv.	Cant. (g)	Cant. (ml)	mmol
DUPA- (O ^t Bu) ₃ -OH (4)	488,57		1,0	0,46 g		0,95
NH ₂ -PEG ₂ -Phe-Tyr-(O ^t Bu)-O ^t Bu (12)	599,76		1,05	0,60 g		1,0
HATU	380,24		1,05	0,38 g		1,0
DIPEA	129,24	0,742	2,0		0,33 ml	1,90
DMSO			0,33 M		3 ml	

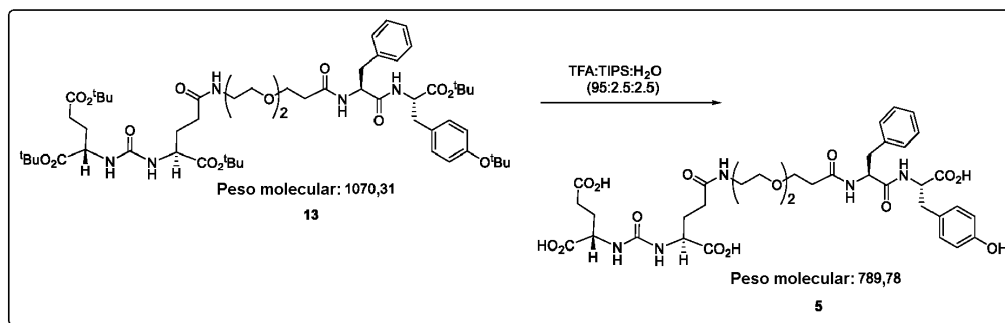
Se cargó un matraz de fondo redondo de 50 ml con una barra agitadora, reactivo 4, ácido 2-[3-(1,3-dicarboxipropil)ureido]pentanodioico (DUPA) con grupos protectores terc-butilo en tres de los cuatro grupos ácido carboxílico (DUPA-(O^tBu)₃-OH [0,46 g, 0,95 mmol, 1 equiv.], compuesto 12 (NH₂-PEG₂-Phe-Tyr-(O^tBu)-O^tBu [0,60 g, 1,0 mmol, 1,05 equiv.] y HATU (0,38 g, 1,0 mmol, 1,05 equiv.). Luego se añadió DMSO (3 ml) al matraz de reacción bajo argón.

Se añadió lentamente DIPEA (0,33 ml, 1,9 mmol, 2,0 equiv.) a la mezcla de reacción a 23°C, durante 5 minutos. La reacción se agitó a 23°C durante 2 horas. La formación del producto se confirmó mediante CL/EM. El detector se selecciona del grupo que consiste en un detector UV de 220 nm (figura 13a), un detector UV de 263 nm (figura 13b), una matriz de diodos (figura 13c) y un espectrómetro de masas (figura 13d).

La mezcla de reacción se añadió gota a gota a una disolución con agitación de 18 ml de ácido cítrico al 5%-NaCl 1 N fría (preparada añadiendo 5,85 g de NaCl a 100 ml de disolución de ácido cítrico al 5%) para formar un sólido gomoso. La goma residual se filtró y se disolvió en acetato de etilo (20 ml) y se lavó con agua (15 ml), seguido de salmuera (15 ml), se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró.

El producto en bruto se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando el 60-80% de EtOAc en diclorometano (DCM) seguido del 5% de metanol en DCM. El compuesto 13 purificado se aisló con un rendimiento del 75%. El detector se selecciona del grupo que consiste en un detector UV de 220 nm (figura 14a), un detector UV de 263 nm (figura 14b), una matriz de diodos (figura 14c) y un espectrómetro de masas (figura 14d).

Etapa VI: desprotección de terc-butilo



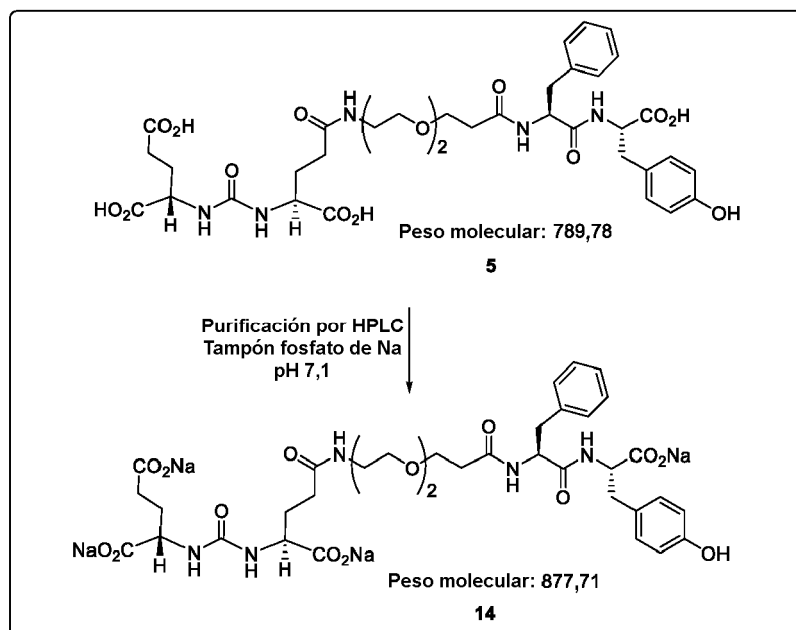
Reactivos para la etapa VI:

Productos químicos	P.M. (g/mol)	Densidad (g/ml)	Equiv.	Cant. (g)	Cant. (ml)	mmol
DUPA-(O ^t Bu) ₃ -PEG ₂ -Phe-Tyr-(O ^t Bu)-O ^t Bu (13)	1070,31		1,0	0,6 g		0,56
TFA:TIPS:H ₂ O 95:2,5:2,5			Exceso		3,0 ml	

Se cargó un matraz de fondo redondo de 25 ml con una barra agitadora y el compuesto 13 (DUPA-(O^tBu)₃-PEG₂-Phe-Tyr-(O^tBu)-O^tBu [0,50 g, 0,56 mmol, 1 equiv.]). Se añadió una disolución de TFA:TIPS:H₂O (95:2,5:2,5, 3,0 ml) al matraz de reacción a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y el avance de la reacción se monitorizó mediante CL/EM.

La mezcla de reacción se evaporó a vacío (rotavapor) y la mezcla de reacción concentrada se añadió gota a gota a éter frío con agitación (30 ml) para dar un precipitado blanco del compuesto 5 (DUPA-PEG₂-Phe-Tyr-SO456). El producto precipitado se centrifugó, se lavó con éter frío (2 x 20 ml) y se secó a alto vacío para proporcionar el compuesto 5 como un sólido blanco. El compuesto 10 se aisló con rendimiento cuantitativo. El detector se selecciona del grupo que consiste en un detector UV de 220 nm (figura 15a), un detector UV de 263 nm (figura 15b), una matriz de diodos (figura 15c) y un espectrómetro de masas (figura 15d).

Purificación del compuesto 5



Preparación de la muestra:

Se suspendieron 2 gramos del compuesto 5 en bruto en tampón fosfato de sodio (pH 7,1, 30 ml) y el pH se ajustó a 7,5 usando NaHCO₃ saturado acuoso con agitación para formar una disolución transparente de color amarillo pálido.

La disolución se filtró a través de un filtro de 2 µm antes de inyectarla en HPLC.

5 Método de CL/EM para la purificación del compuesto 10: instrumento: Acquity UPLC, columna Waters: BEH C18, 10 µm, 250 × 50 mm. El 40% - 98% de fosfato de sodio 10 mM acuoso a pH 7,1 que incluye fosfato de monosodio monohidratado (0,051%) + fosfato de disodio heptahidratado (0,169%) con el 2% - 60% de acetonitrilo en 45 minutos siguiendo el programa de gradiente que se muestra en la tabla 2. La velocidad de flujo es de 50 ml/min. El detector se selecciona del grupo que consiste en un detector UV de 220 nm (figura 7a), un detector UV de 275 nm (figura 7b), una matriz de diodos (figura 7c).

Tabla 2: eluyente A: fosfato de sodio acuoso 10 mM a pH 7,1 que incluye fosfato de monosodio monohidratado (0,051%) + fosfato de disodio heptahidratado (0,169%); eluyente B: acetonitrilo:

Tiempo	Velocidad de flujo ml/min	% de A	% de B
0	50	98	2
15	50	75	25
22	50	40	60
30	50	40	60
45	50	98	2
55	50	98	2
55,01	50	98	2

10 Método de desalinización de 14 mediante HPLC

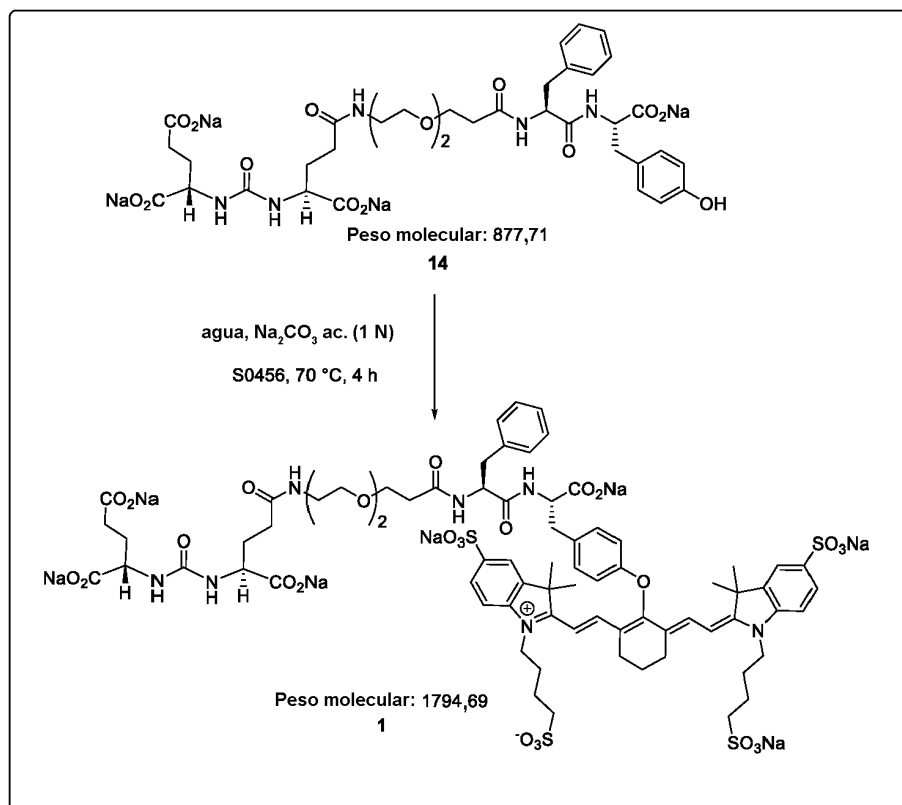
Método de CL/EM para la purificación del compuesto 10: instrumento: Acquity UPLC, columna Waters: BEH C18, 10 µm, 250 x 50 mm. El 10% - 99% de agua con el 1% - 90% de acetonitrilo en 45 minutos siguiendo el programa de gradiente que se muestra en la tabla 3. La velocidad de flujo es de 50 ml/min. El detector se selecciona del grupo que consiste en un detector UV de 220 nm (figura 13a), un detector UV de 275 nm (figura 16b), una matriz de diodos (figura 16c), un espectrómetro de masas (figura 16d) y una matriz de diodos (figura 16e).

Tabla 3: eluyente A: agua; eluyente B: acetonitrilo:

Tiempo	Velocidad de flujo ml/min	% de A	% de B
0	50	99	1
15	50	99	1
25	50	10	90
28	50	10	90
35	50	99	1
45	50	99	1
45,01	50	99	1

20 Las fracciones puras combinadas de 14 se evaporaron a vacío (en un rotavapor a una temperatura del baño de agua de 37°C) para evaporar el acetonitrilo y llevar el volumen total a 50 ml y se inyectaron en HPLC para eliminar las sales de fosfato. Las fracciones puras se concentraron a vacío (en un rotavapor a una temperatura del baño de agua de 37°C) y se liofilizaron después de la congelación para producir un sólido blanco del compuesto 10.

Etapa VII: adición de S0456



Reactivos para la etapa VII:

Productos químicos	P.M. (g/mol)	Densidad (g/ml)	Equiv.	Cant. (g)	Cant. (ml)	mmol
DUPA_PEG ₂ _Phe_Tyr-OH (14)	877,71		1,00	5,00 g		5,697
S0456 (sal de sodio)	953,44		1,00	5,431 g		5,697
Na ₂ CO ₃ (ac. 1,0 M)	105,98		1,10		6,27 ml	6,266
H ₂ O		1,0	[0,1 M]*		50,73 ml	
Sílice	200-400 de malla, 40-70 µm			60+60g		
Acetona					500 ml	
10% de agua + 90% de acetona					15 l	
10% de agua + 90% de acetonitrilo					12 l	
30% de agua + 70% de acetonitrilo					2 l	

* disolución ac. de Na₂CO₃ 1,0 M + agua, juntos hacen una concentración de 0,1 M con respecto a 14.

- 5 Se cargó un matraz de fondo redondo de 200 ml con una barra agitadora y el compuesto 14 (DUPA_PEG₂_Phe_Tyr-OH) [5,0 g, 5,697 mmol, 1 equiv.]. Se añadió agua (50,73 ml) al matraz de fondo redondo y se agitó la suspensión para dar una disolución transparente e incolora, disolución VII-A.

Se añadió una disolución recién preparada de Na₂CO₃ ac. 1,0 M (6,27 ml, 6,697 mmol, 1,1 equiv.) a la disolución VII-A lentamente a 23°C durante 5 min para alcanzar un pH de 10,4. El pH de la disolución se registró usando un medidor de pH.

- 10 Se añadió sal de sodio de S0456 (5431 g, 5,697 mmol, 1,0 equiv.) a la disolución VII-B y el contenido se agitó hasta que se formó una suspensión verde uniforme, suspensión VII-C.

El matraz que contenía la suspensión VII-C se ensambló con un condensador, se sumergió en un baño de aceite a 70°C y se agitó durante 4 horas. La reacción se monitorizó mediante CL/EM cada hora hasta que la conversión fue >98% a 775 nm (formación de OTL0078 en comparación con el consumo de S0456).

La mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente usando un baño de agua.

- 5 Se cargó un vaso de precipitados de 1 l con 60 g de sílice y la mezcla de reacción de la etapa 5 se transfirió a la sílice. La mezcla de reacción se mezcló usando una espátula hasta que la sílice adquirió un color verde oscuro uniforme.

- 10 Se añadió acetona (250 ml) a la sílice de color verde oscuro y se agitó con la espátula. Se dejó sedimentar la sílice y se decantó el sobrenadante. Esta etapa se repitió con otros 250 ml de acetona seguido de 250 ml de una mezcla del 10% de agua + 90% de acetona.

- 15 Se rellenó una columna usando 60 g de sílice en acetona (600 ml) y se presurizó hasta que el nivel de acetona estuvo justo por encima de la sílice. La mezcla de sílice verde (~ 60 g) de la etapa 7 se añadió encima del lecho de sílice empacado suspendiéndolo en una mezcla del 10% de agua + 90% de acetona. El lecho de sílice verde se cubrió con un poco de arena para evitar daños al lecho de sílice. El lecho de la columna (60 g de sílice y ~ 60 g de sílice + mezcla de reacción verde de la etapa 7) se lavó con una mezcla del 10% de agua + 90% de acetona (15 l) seguido del 10% de agua + 90% de acetona (12 l).

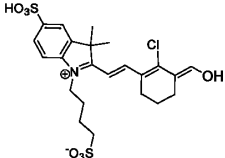
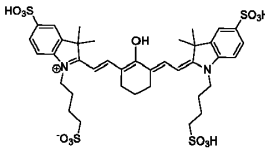
- 20 Luego se lavó la columna con el 30% de agua + 70% de acetonitrilo (2 l) hasta que todo el material verde eluyó de la columna de sílice y se recogió en fracciones. Después de evaluar la pureza de las fracciones mediante CL/EM, las fracciones puras se combinaron juntas. Las fracciones combinadas se filtraron a través de un filtro de 0,2 micrómetros para eliminar las partículas de sílice traza (si estaban presentes) y se concentraron a vacío (en un rotavapor a una temperatura del baño de agua de 37°C) para eliminar el acetonitrilo.

Después de congelar el residuo acuoso, se sometió a liofilización durante 48 horas. El detector se selecciona del grupo que consiste en una matriz de diodos de 220 nm (figura 17a), una matriz de diodos de 490 nm (figura 17b), una matriz de diodos de 550 nm (figura 17c), una matriz de diodos de 775 nm (figura 17d).

- 25 Después de reevaluar la pureza del material usando CL/EM, el sólido verde seco se almacenó en botellas de color ámbar.

El compuesto 1 purificado (OTL78) se aisló con un rendimiento del 72,3% (7,4 g).

La tabla 4 incluye posibles impurezas:

Etiqueta del pico/tiempo de retención (min) en la figura 25	Estructura probable
A/3,38	 Peso molecular: 530,05
B/3,25	Desconocido
C/2,82	 Peso molecular: 869,05
1,04	compuesto 11
3,06	S0456

- 30 Método de UPLC/EM con columna de HPLC para la purificación del compuesto 1: instrumento: Acquity UPLC, columna Waters: Silica Chrome® PPF nec, 3 µm, 4,6 x 150 mm. El 30% - 97% de fosfato de sodio 10 mM acuoso a pH 7,1 que incluye fosfato de monosodio monohidratado (0,051%) + fosfato de disodio heptahidratado (0,169%) con el 3% - 70% de acetonitrilo en 45 minutos siguiendo el programa de gradiente que se muestra en la tabla 5. La velocidad de flujo es de 0,4 ml/min. El detector se selecciona del grupo que consiste en un detector UV de 220 nm (figura 7a), un detector UV de 275 nm (figura 7b), una matriz de diodos (figura 7c).

- 35 Tabla 5: eluyente A: fosfato de sodio acuoso 10 mM a pH 7,1 que incluye fosfato de monosodio monohidratado

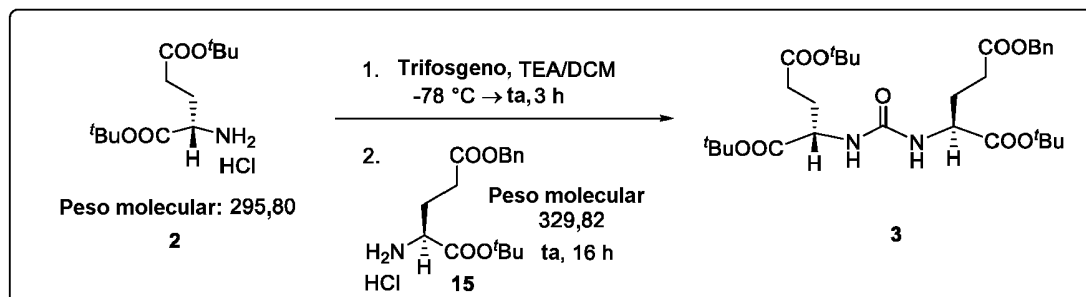
(0,051%) + fosfato de disodio heptahidratado (0,169%); eluyente B: acetonitrilo:

Tiempo	Velocidad de flujo ml/min	% de A	% de B
0	0,45	97	3
30	0,45	70	30
35	0,45	30	70
40	0,45	97	3
45	0,45	97	3
45,01	0,45	97	3

Las figuras 19a-d ilustran la detección del compuesto 1 a longitudes de onda de 220 nm (figura 19a), 490 nm (figura 19b), 550 nm (figura 19c) y 775 nm (figura 19d) después de la purificación en columna de sílice y la liofilización del método de CL/EM de la etapa VII. Las figuras 20a-d ilustran la detección del compuesto 1 a longitudes de onda de 490 nm (figura 20a), 550 nm (figura 20b), 775 nm (figura 20c) y 265 nm (figura 20d) después de la purificación en columna de sílice y la liofilización del método UPLC/EM. Las figuras 21a-c ilustran la detección del compuesto 1 a longitudes de onda de 490 nm (figura 21a), 550 nm (figura 21b) y 775 nm (figura 21c) después de la purificación por HPLC. Las figuras 22a-c son vistas ampliadas de las figuras 21a-c, respectivamente. Las figuras 23a-d ilustran la detección del compuesto 1 a longitudes de onda de 490 nm (figura 23a), 550 nm (figura 23b), 775 nm (figura 23c) y 265 nm (figura 23d) después de UPLC con columna de HPLC después de la purificación por HPLC. Las figuras 24a-c son vistas ampliadas de las figuras 23a-c, respectivamente.

Etapas VIII

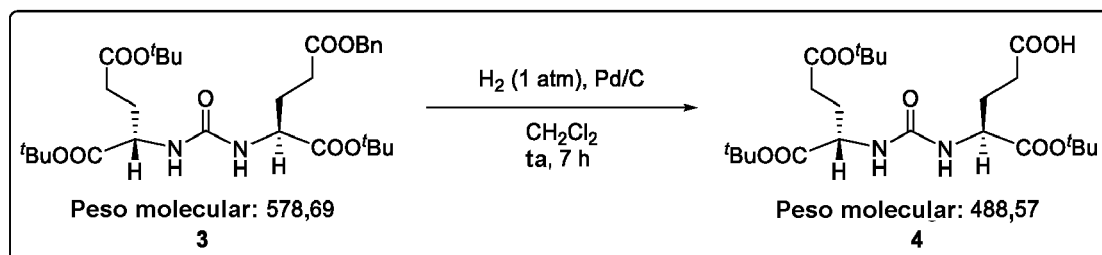
Síntesis de 2-(3-((S)-1,5-di-*tert*-butoxi-1,5-dioxopentan-2-il)ureido)pentanodioato de (S)-5-bencil-1-*tert*-butilo (15)



Se cargó un matraz de fondo redondo de 500 ml con el compuesto 2, ácido glutámico con grupos protectores *tert*-butilo en cada grupo hidroxilo de cada grupo ácido carboxílico (6,0 g, 20,28 mmol, 1 equiv.) y trifosgeno (1,805 g, 6,69 mmol, 0,333 equiv.) bajo una atmósfera de argón. Se añadieron aproximadamente 210 ml de diclorometano bajo una atmósfera inerte para dar una disolución transparente y se enfrió hasta -78°C en un baño de hielo seco/acetona (suspensión VIII-A). Se añadió gota a gota trietilamina (9,9 ml, 8,19 mmol, 3,5 equiv.) a la mezcla de reacción (suspensión VIII-A) en 10 minutos para formar una suspensión blanca espesa. La mezcla de reacción se dejó calentar hasta temperatura ambiente y se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente (suspensión VIII-A). Se cargó otro matraz de fondo redondo de 100 ml con el compuesto 15, ácido glutámico con un grupo protector *tert*-butilo en el grupo hidroxilo del grupo ácido carboxílico alfa y un grupo bencilo en el hidroxilo del ácido carboxílico de cadena lateral (6,69 g, 20,28 mmol, 1,0 equiv.) y se disolvieron en 40 ml de DCM (disolución VIII-B). Se añadió trietilamina (5,65 ml, 40,56 mmol, 2,0 equiv.) a la suspensión VIII-B en 2 minutos, seguido de la adición gota a gota de la suspensión VIII-B a la suspensión VIII-A a través de una cánula durante un periodo de 30 minutos para dar una suspensión blanca. La reacción se agitó a 23°C durante 12 horas. Se añadieron a la reacción 400 ml de HCl acuoso 1 M y se agitó durante 1 hora más. La mezcla de reacción se extrajo usando EtOAc en tres extracciones de 200 ml.

Los extractos orgánicos combinados se lavaron con 100 ml de agua dos veces seguido de 100 ml de salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron a vacío para obtener el compuesto 3 como un aceite transparente espeso (14,10 g), que se sometió a la siguiente etapa sin purificación adicional.

Síntesis de ácido (S)-5-(*tert*-butoxi)-4-(3-((S)-1,5-di-*tert*-butoxi-1,5-dioxopentan-2-il)ureido)-5-oxopentanoico (compuesto 4, DUPA)

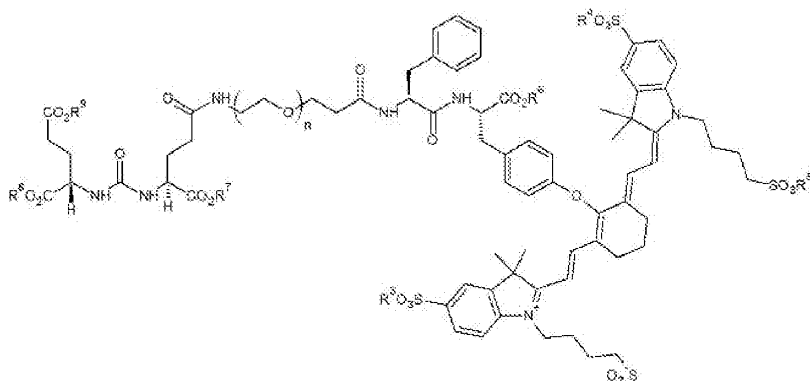


5

En un matraz de fondo redondo de 500 ml, se disolvieron 14,1 gramos del compuesto 3 en 200 ml de DCM. Se añadieron 6 gramos de Pd al 10%/C bajo una atmósfera de argón. La mezcla de reacción se agitó a presión atmosférica de hidrógeno durante 7 horas. La reacción se monitorizó mediante CCF. Tras completarse la reacción, se eliminó el Pd/C mediante filtración a través de un lecho de Celite y luego se lavó con DCM y se concentró el filtrado. El producto en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (hexano:EtOAc, 40:60) para dar el compuesto 4 como un aceite incoloro. La cristalización usando hexano:DCM proporcionó un sólido blanco (8,01 g, rendimiento del 80% en dos etapas).

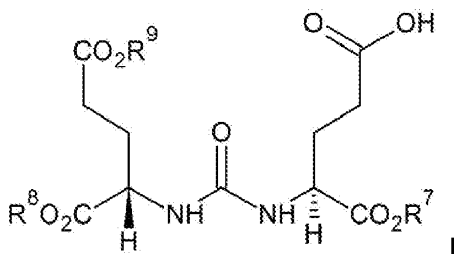
REIVINDICACIONES

1. Un método para sintetizar un compuesto de fórmula:

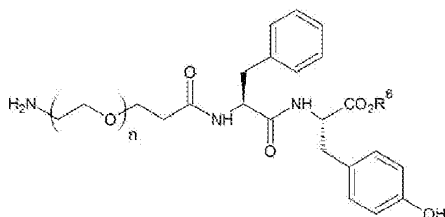


que comprende las etapas de:

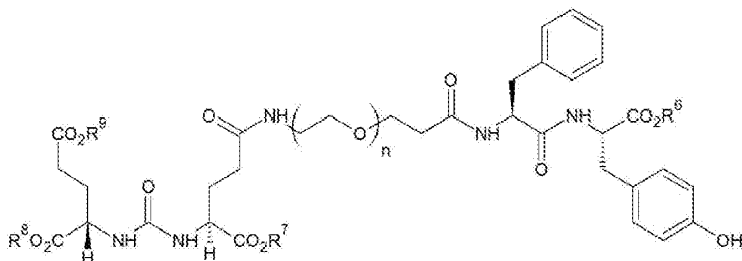
- 5 (a) hacer reaccionar un compuesto de fórmula I:



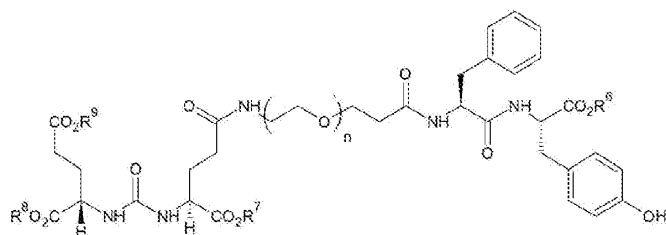
con un compuesto de fórmula:



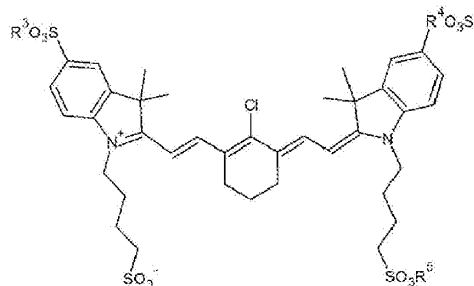
- 10 en presencia de un disolvente orgánico polar, hexafluorofosfato de 3-óxido de 1-[bis(dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio y N,N-diisopropiletilamina bajo argón para proporcionar un compuesto de fórmula:



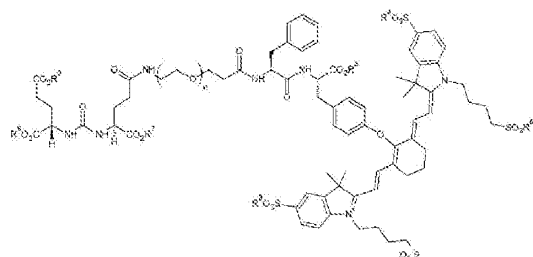
- (b) hacer reaccionar el compuesto de fórmula:



con carbonato de sodio y un compuesto de colorante de fórmula:



(c) aislar el compuesto de fórmula:



5

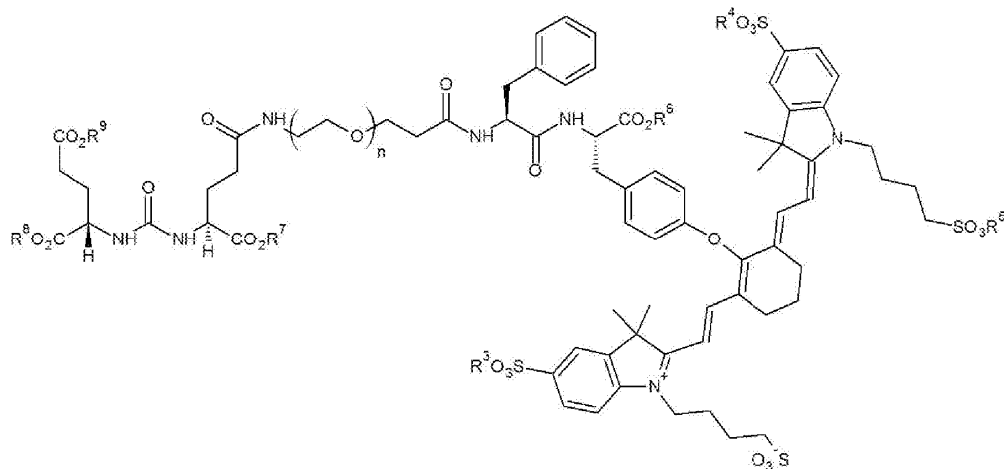
en las que n es 0, 1, 2, 3 o 4, y

en las que:

R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸ y R⁹ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H⁺, Na⁺, K⁺ y NH₄⁺.

10 2.

Un método para sintetizar una forma isotópica de un compuesto de fórmula:



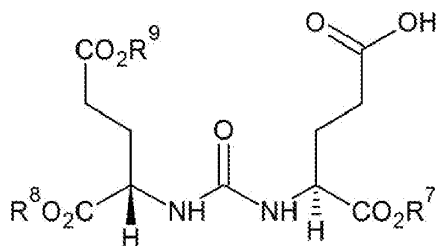
en la que dicha forma isotópica comprende uno o más isótopos de carbono y/o hidrógeno seleccionados del grupo que consiste en H², H³, C¹³ y C¹⁴, y además

en la que R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸ y R⁹ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H⁺, Na⁺, K⁺ y NH₄⁺;

15

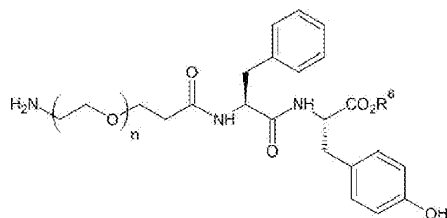
que comprende las etapas de:

(a) hacer reaccionar una forma isotópica de un compuesto de fórmula:



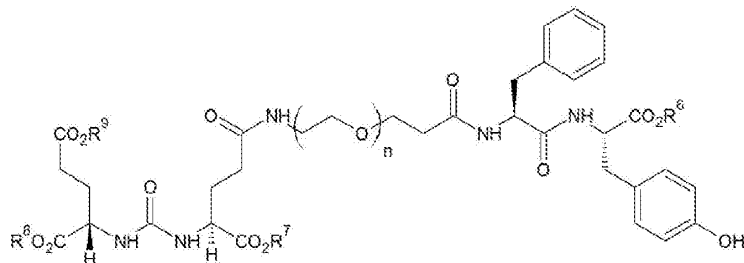
5 en la que dicha forma isotópica comprende uno o más isótopos de carbono y/o hidrógeno seleccionados del grupo que consiste en H², H³, C¹³ y C¹⁴,

con una forma isotópica de un compuesto de fórmula:



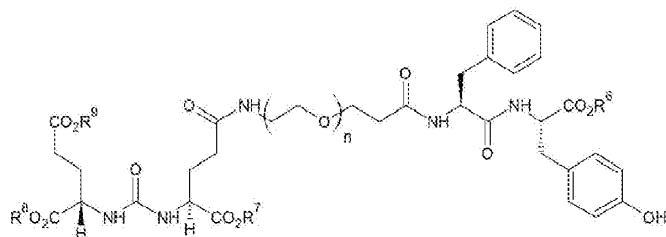
en la que dicha forma isotópica comprende uno o más isótopos de carbono y/o hidrógeno seleccionados del grupo que consiste en H², H³, C¹³ y C¹⁴,

10 en presencia de un disolvente orgánico polar, hexafluorofosfato de 3-óxido de 1-[bis(dimetilamino)metilén]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio y N,N-diisopropiletilamina bajo argón para proporcionar una forma isotópica de un compuesto de fórmula:

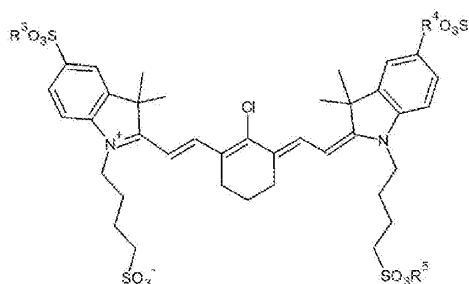


15 en la que dicha forma isotópica comprende uno o más isótopos de carbono y/o hidrógeno seleccionados del grupo que consiste en H², H³, C¹³ y C¹⁴,

(b) hacer reaccionar la forma isotópica del compuesto de fórmula:

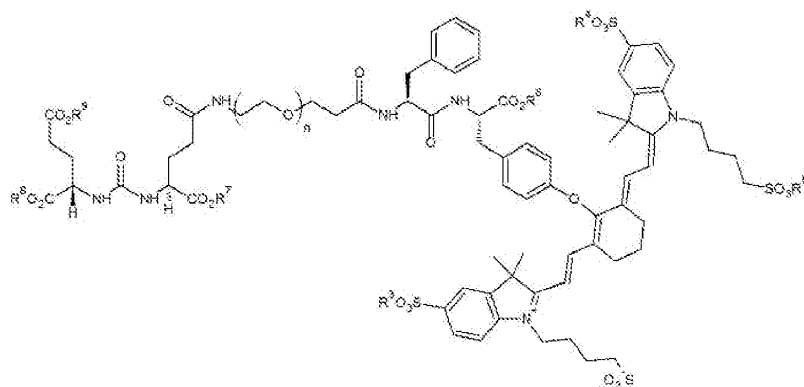


con carbonato de sodio y una forma isotópica de un compuesto de colorante de fórmula:



en la que dicha forma isotópica comprende uno o más isótopos de carbono y/o hidrógeno seleccionados del grupo que consiste en H², H³, C¹³ y C¹⁴,

(c) aislar la forma isotópica del compuesto de fórmula:



5

en las que n es 0, 1, 2, 3 o 4, y

en las que R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸ y R⁹ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H⁺, Na⁺, K⁺ y NH₄⁺.

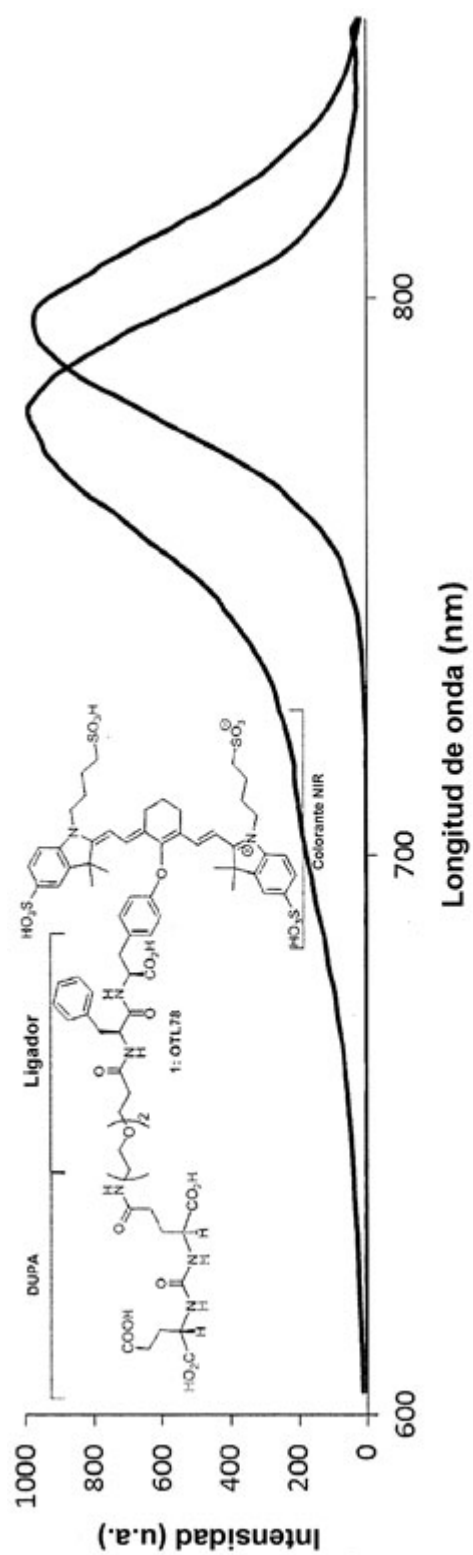


FIG. 1

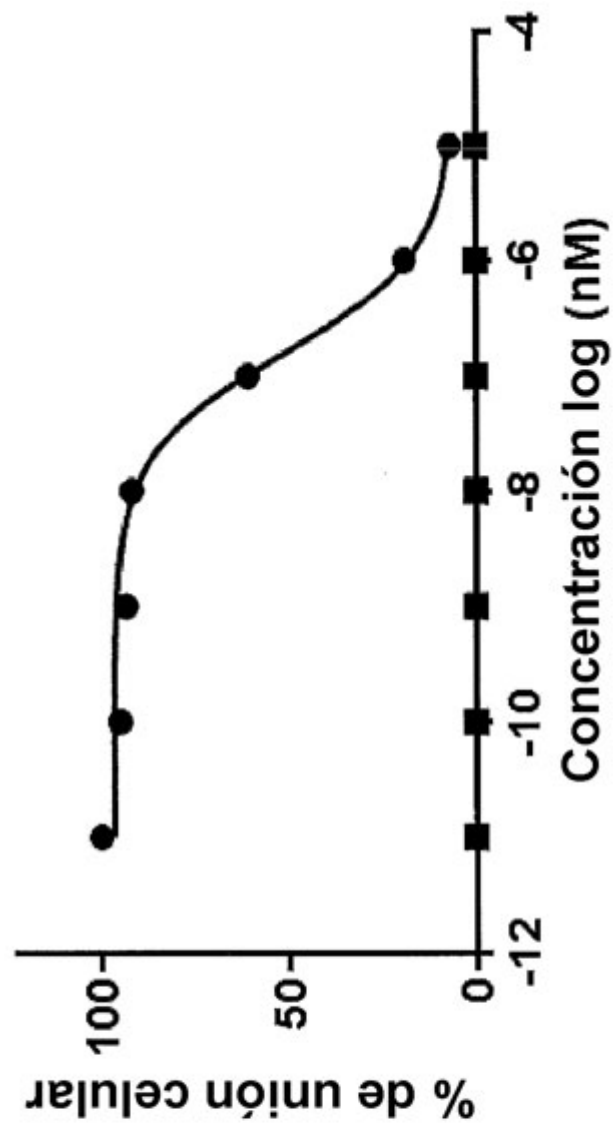


FIG. 2

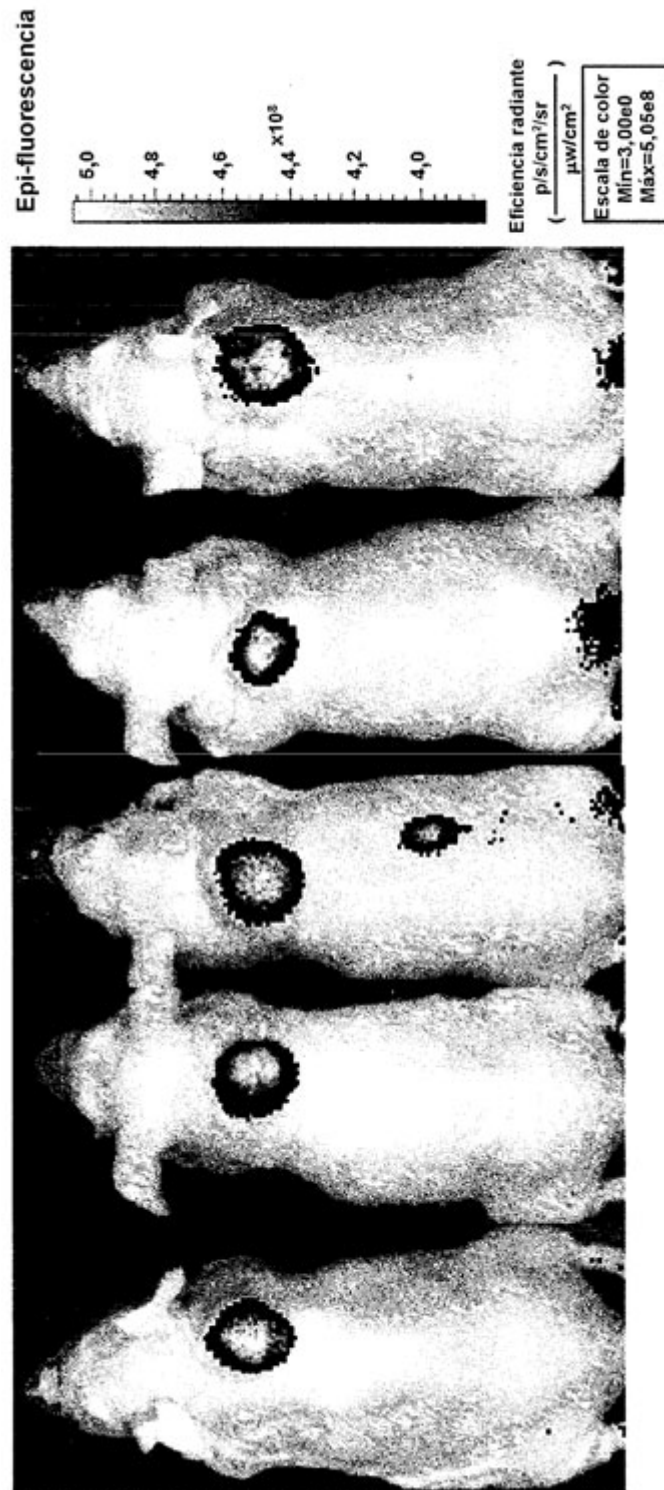


FIG. 3

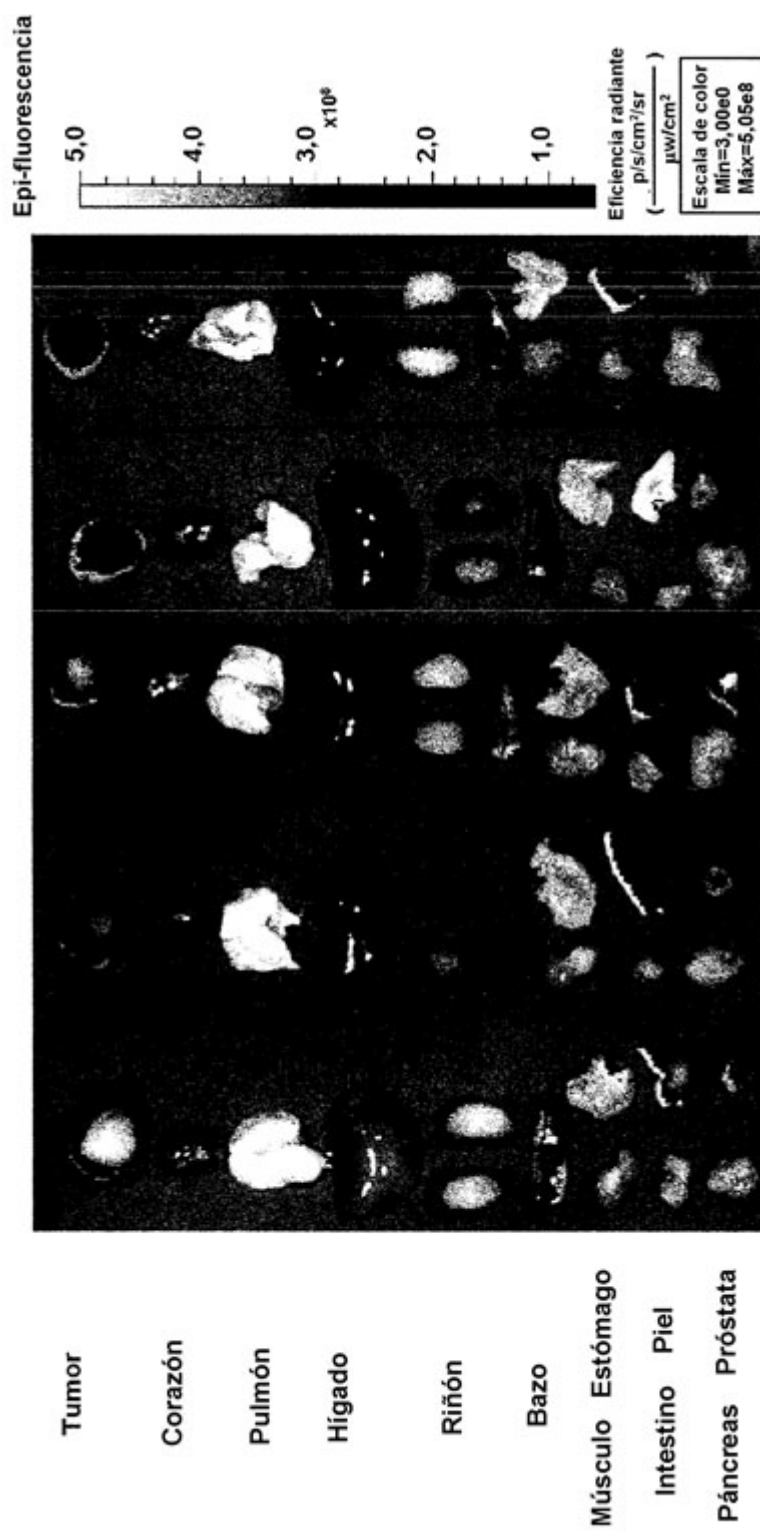


FIG. 4

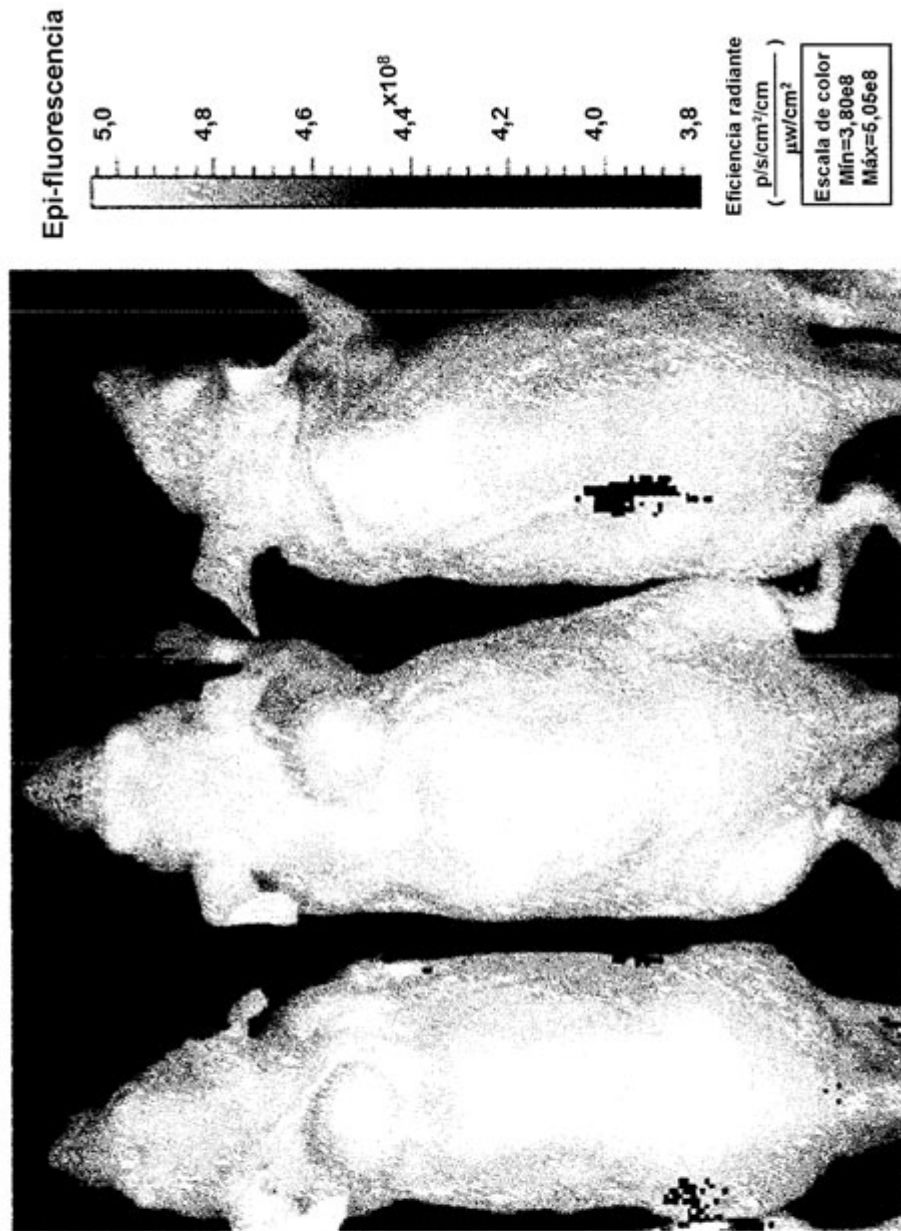


FIG. 5A

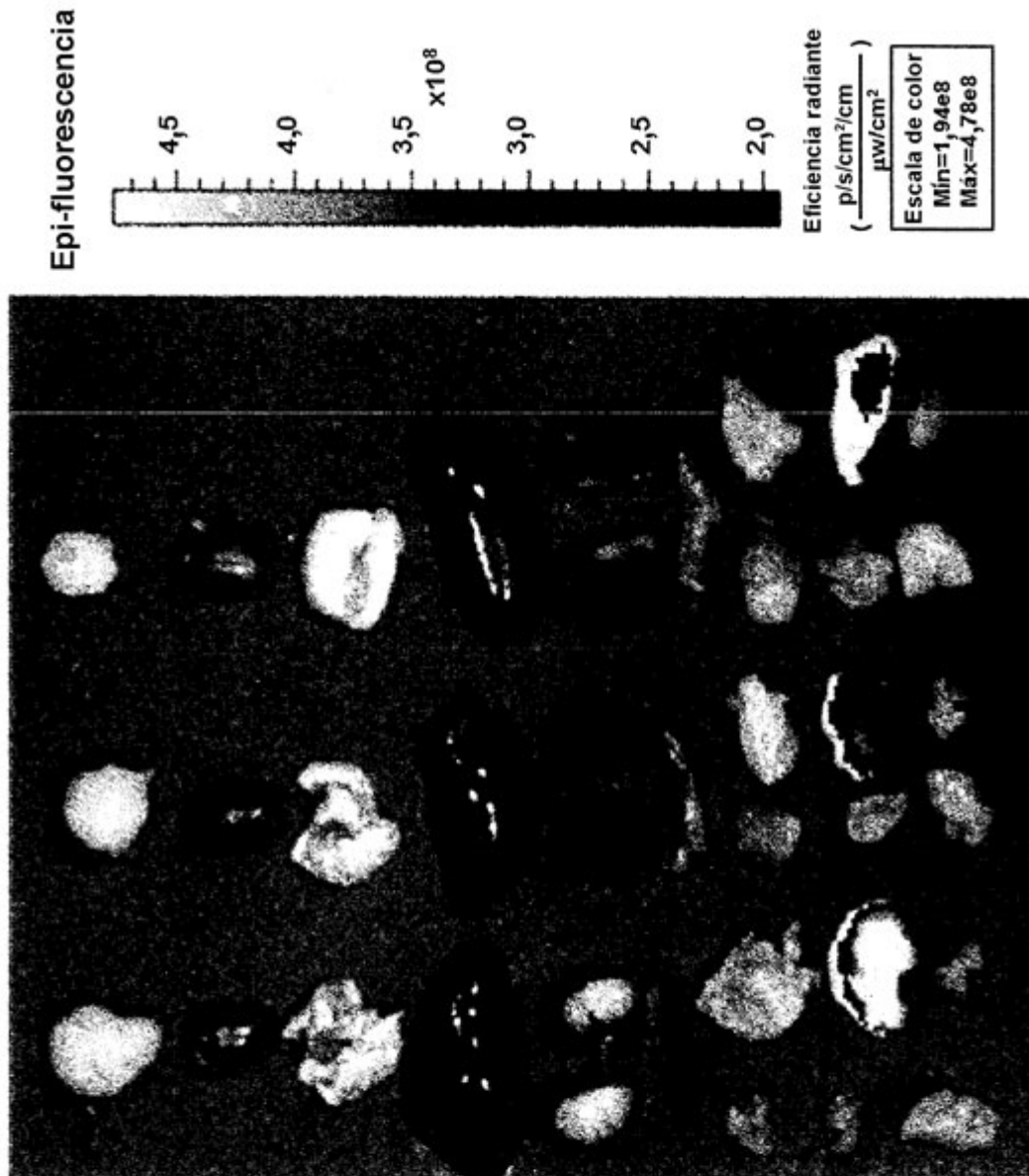


FIG. 5B

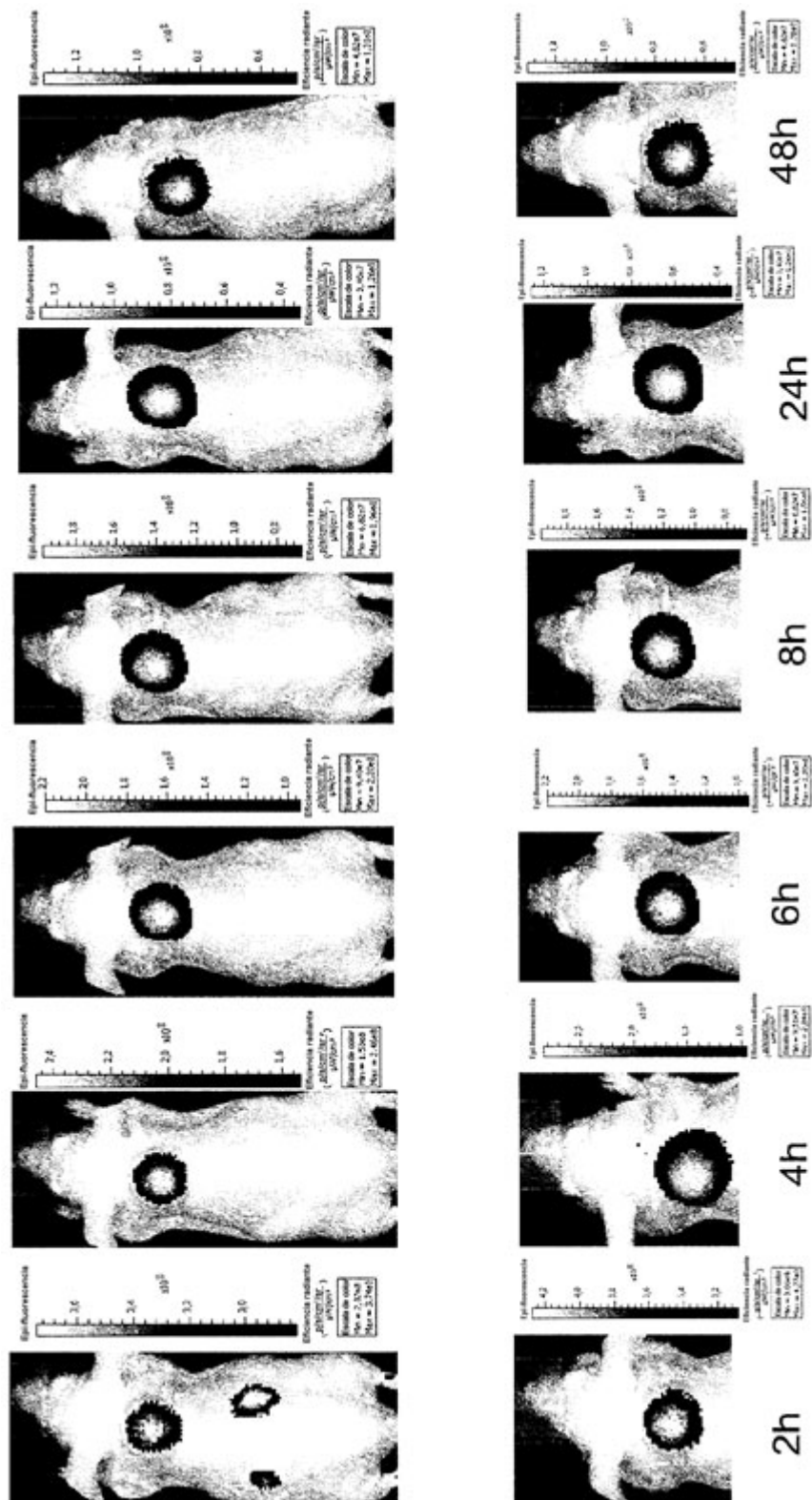
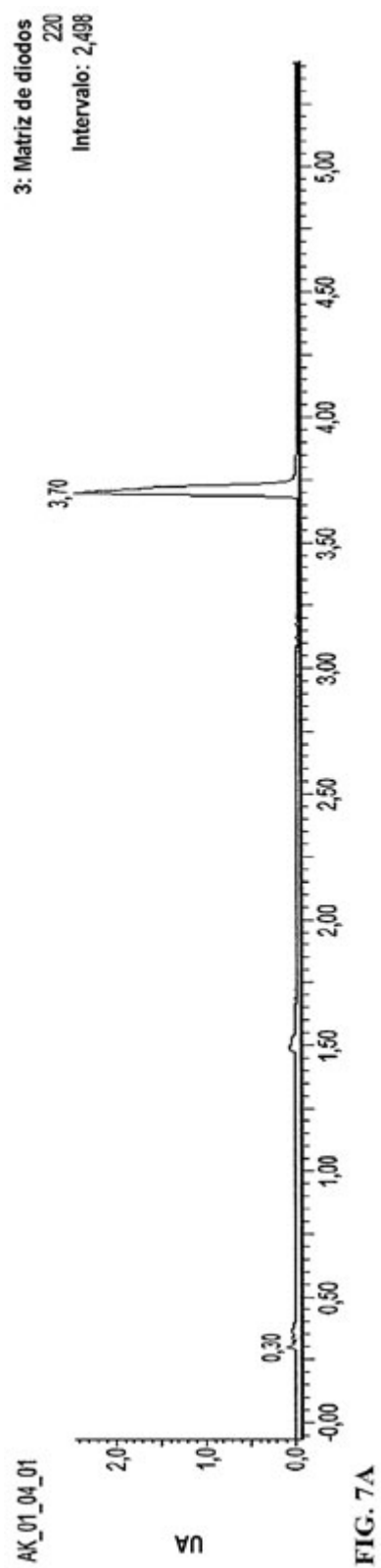
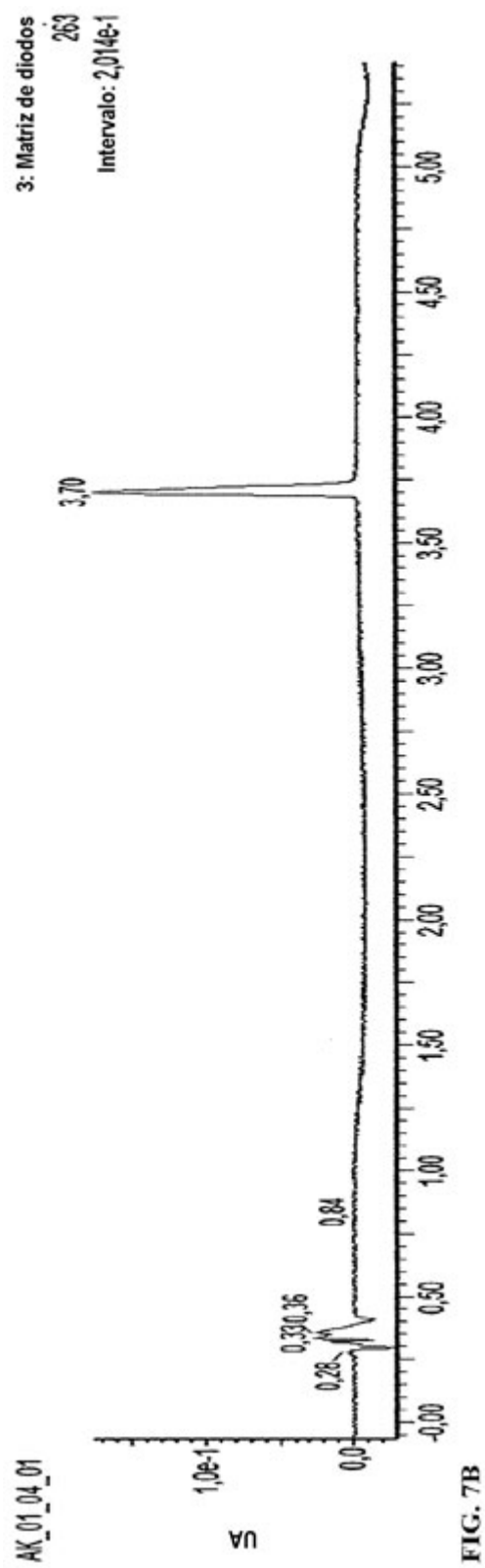
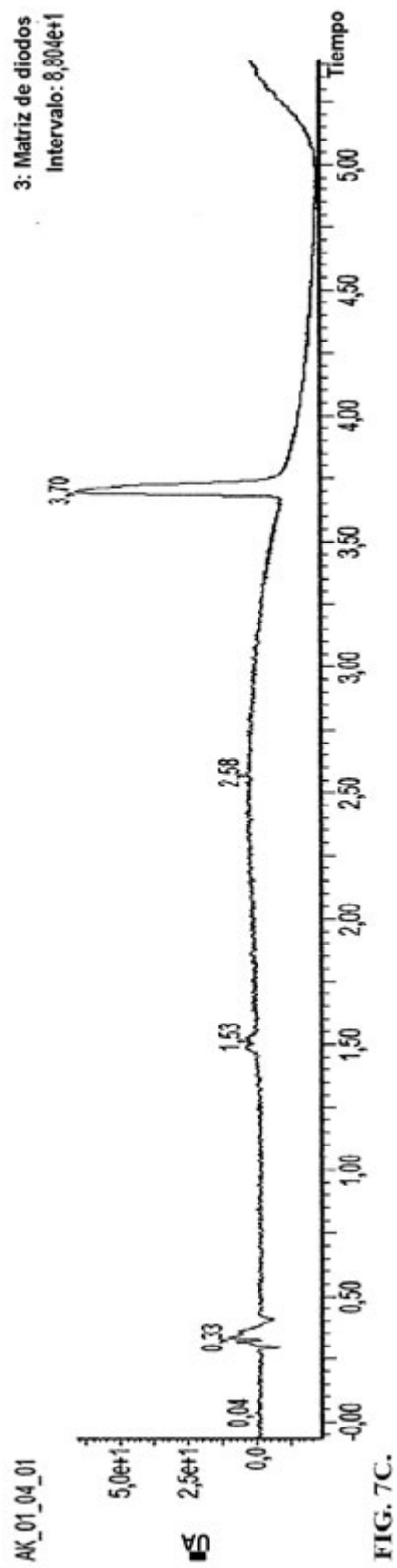
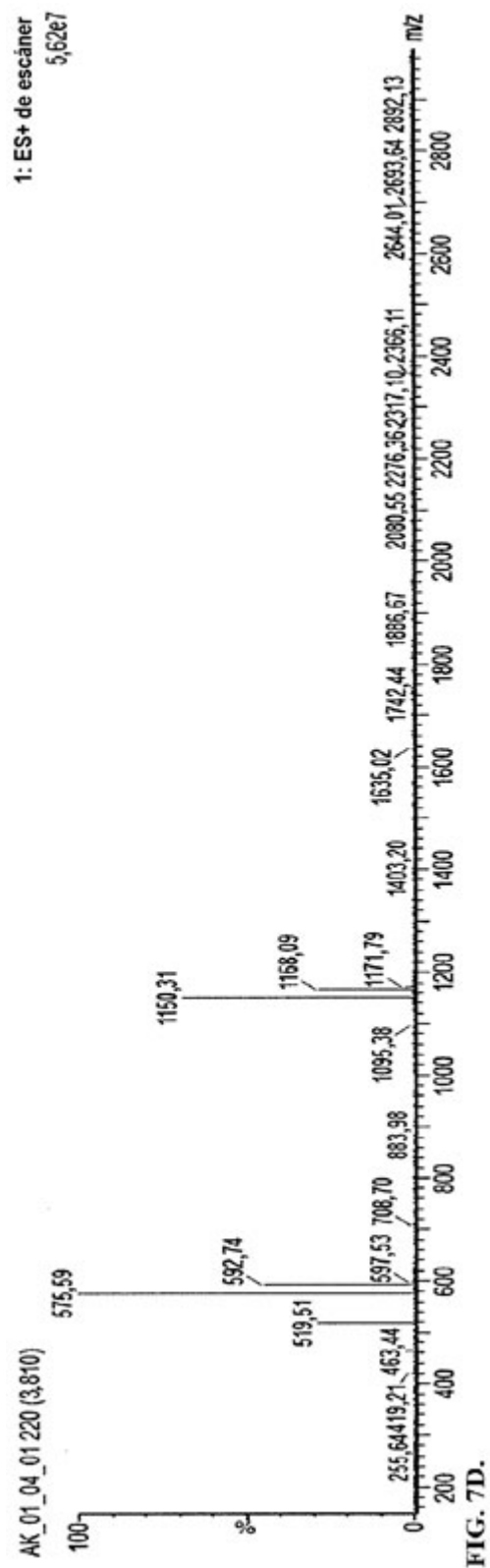


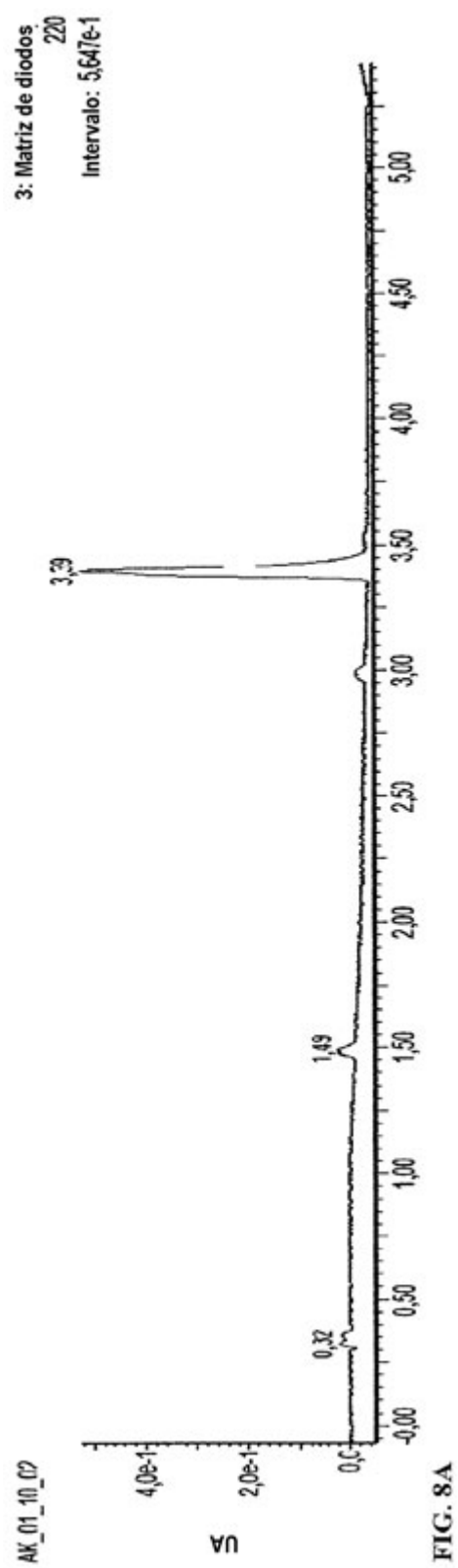
FIG. 6

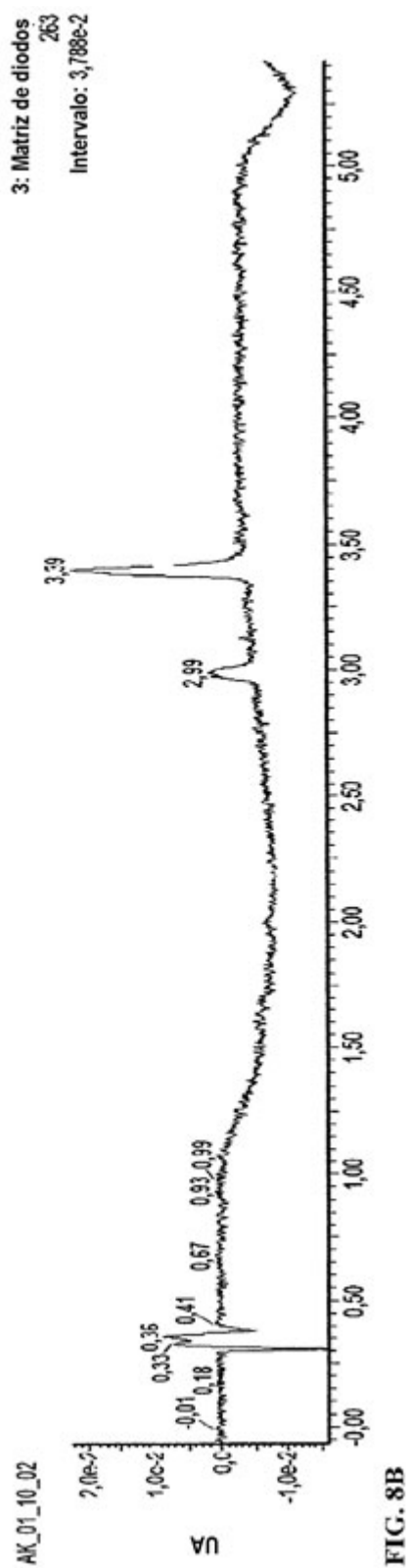


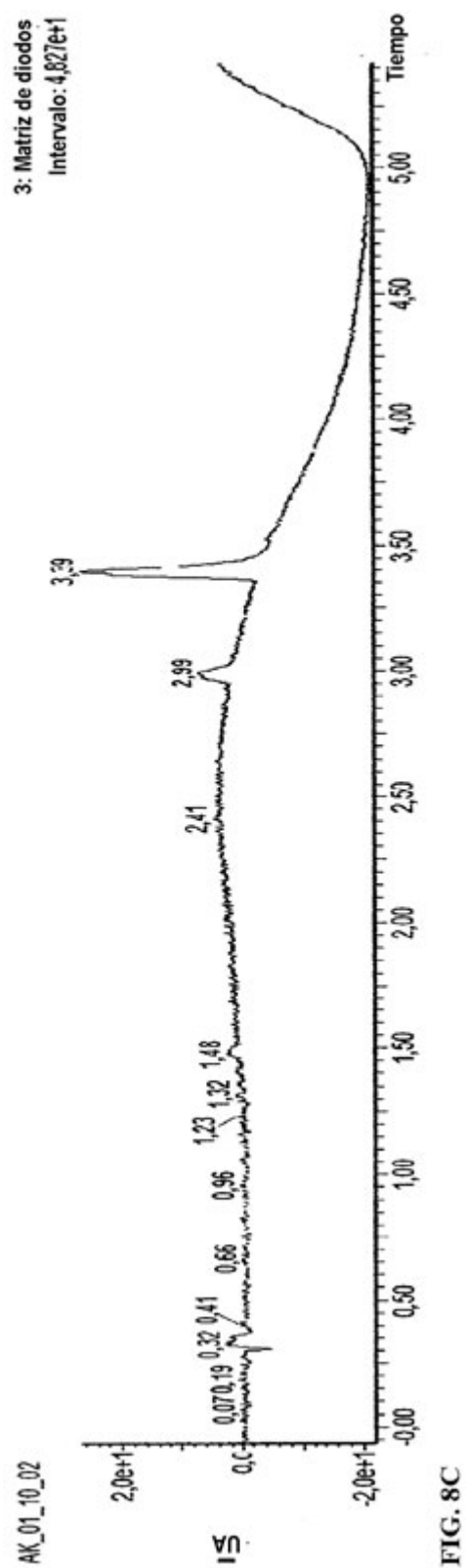


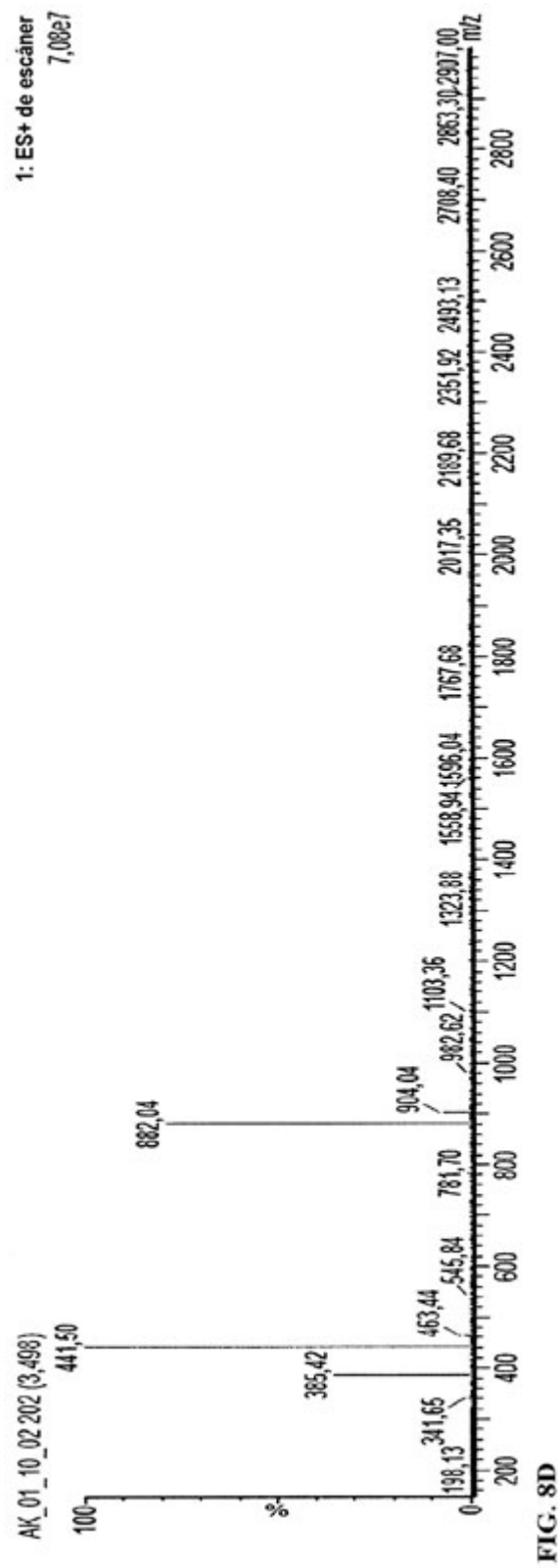


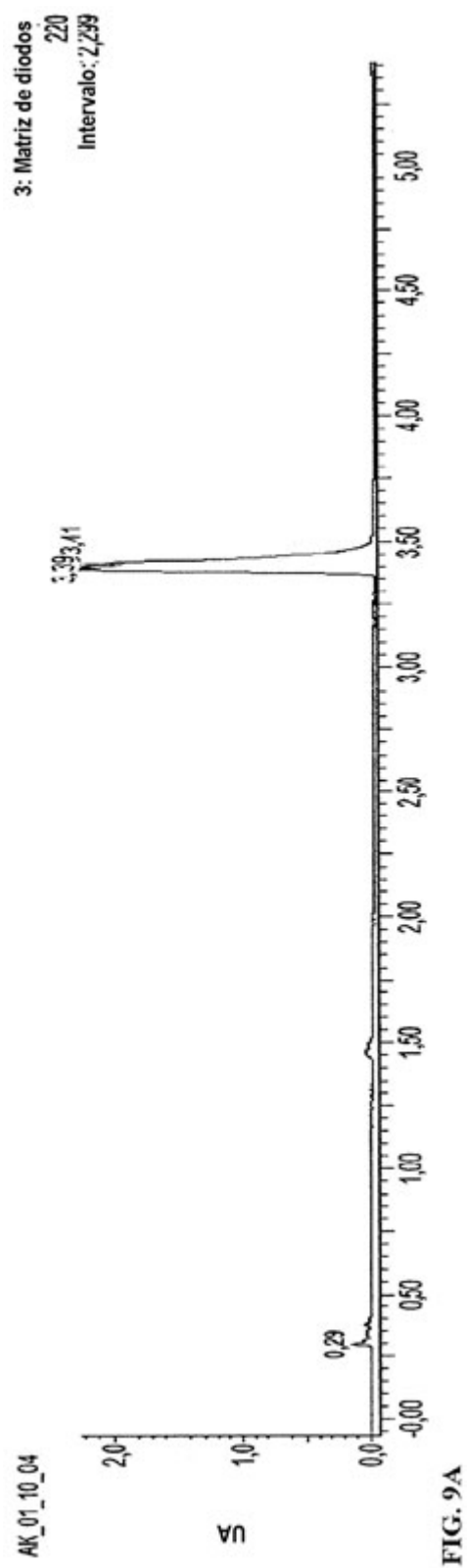


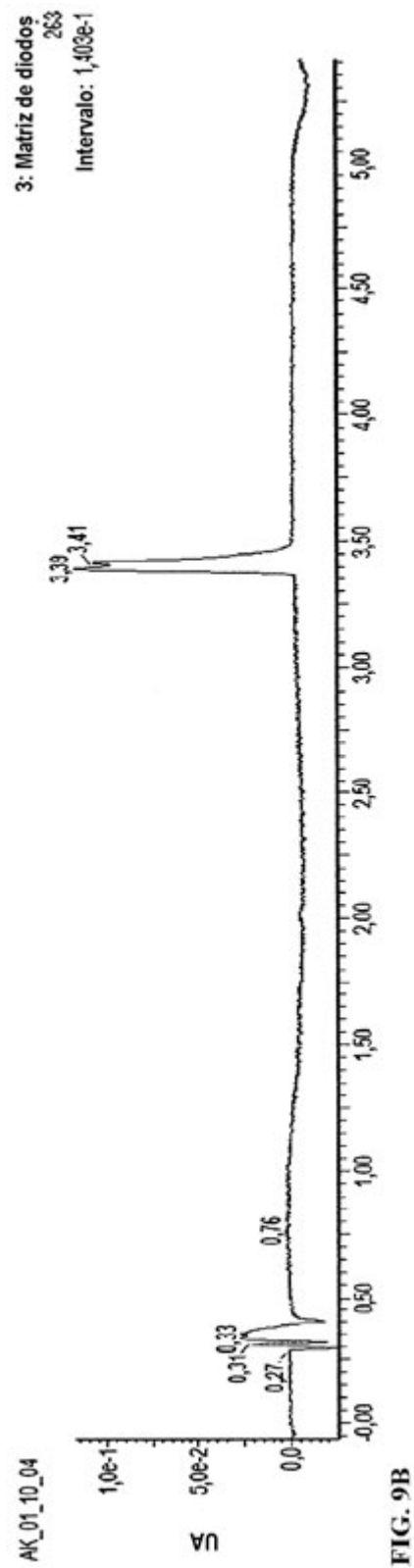












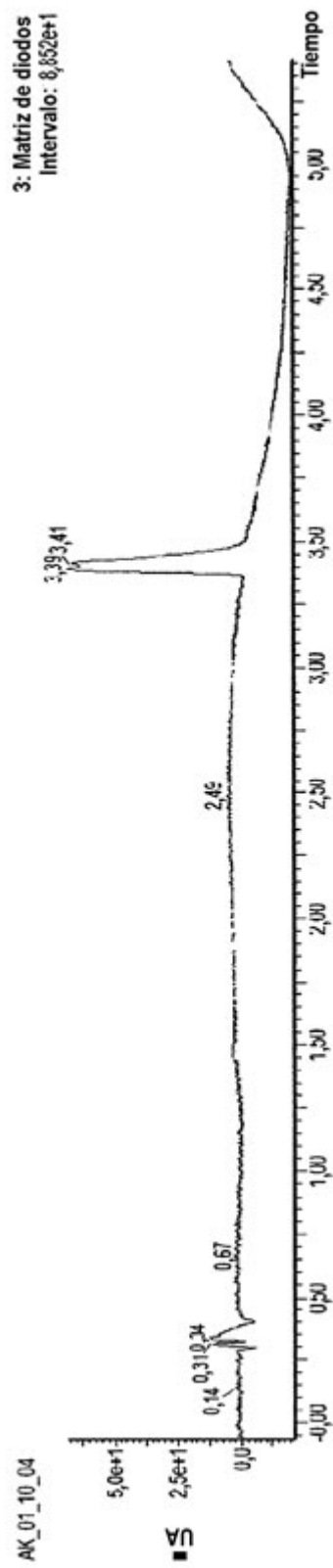
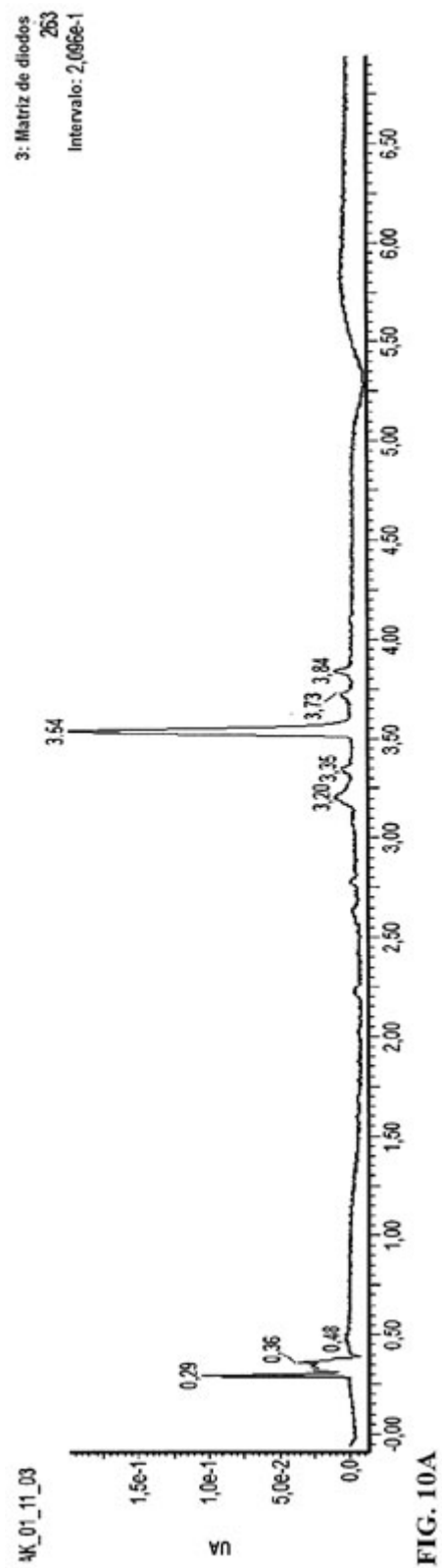
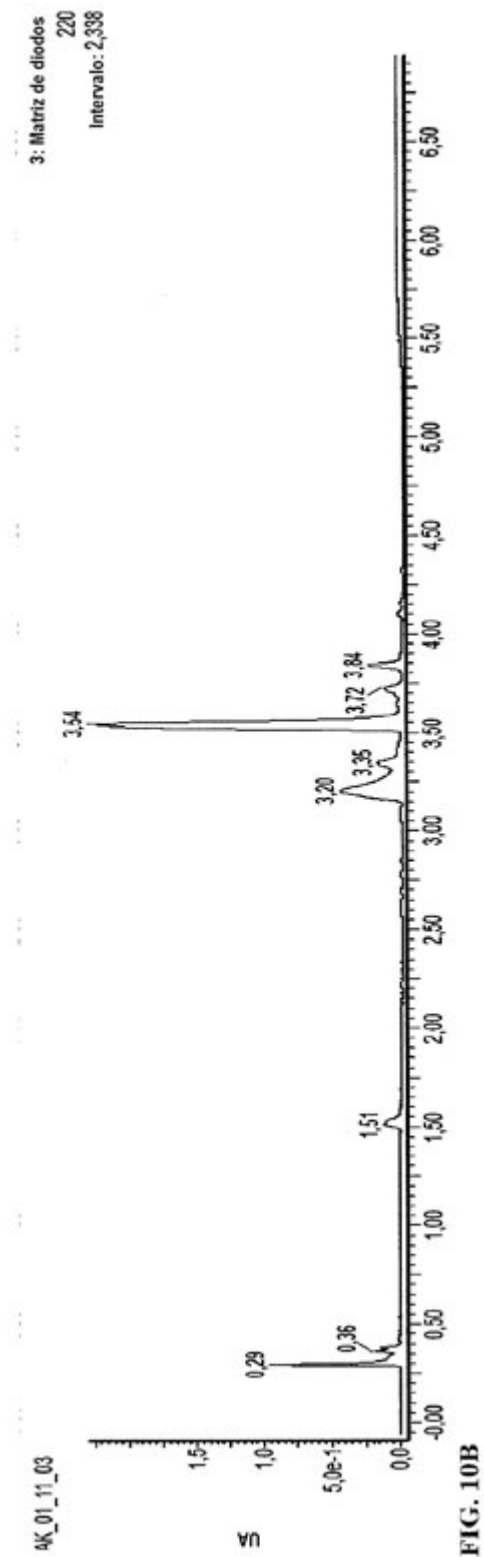


FIG. 9C







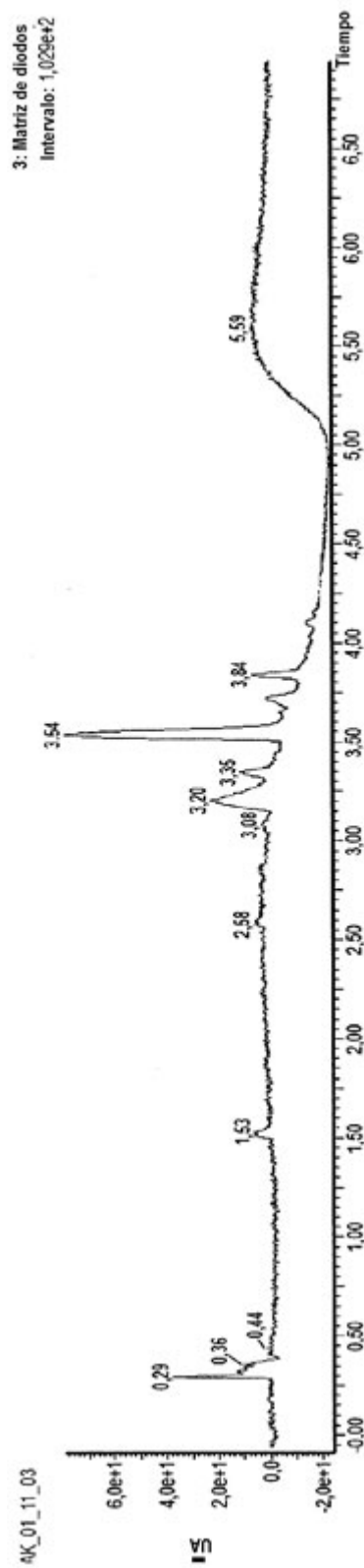
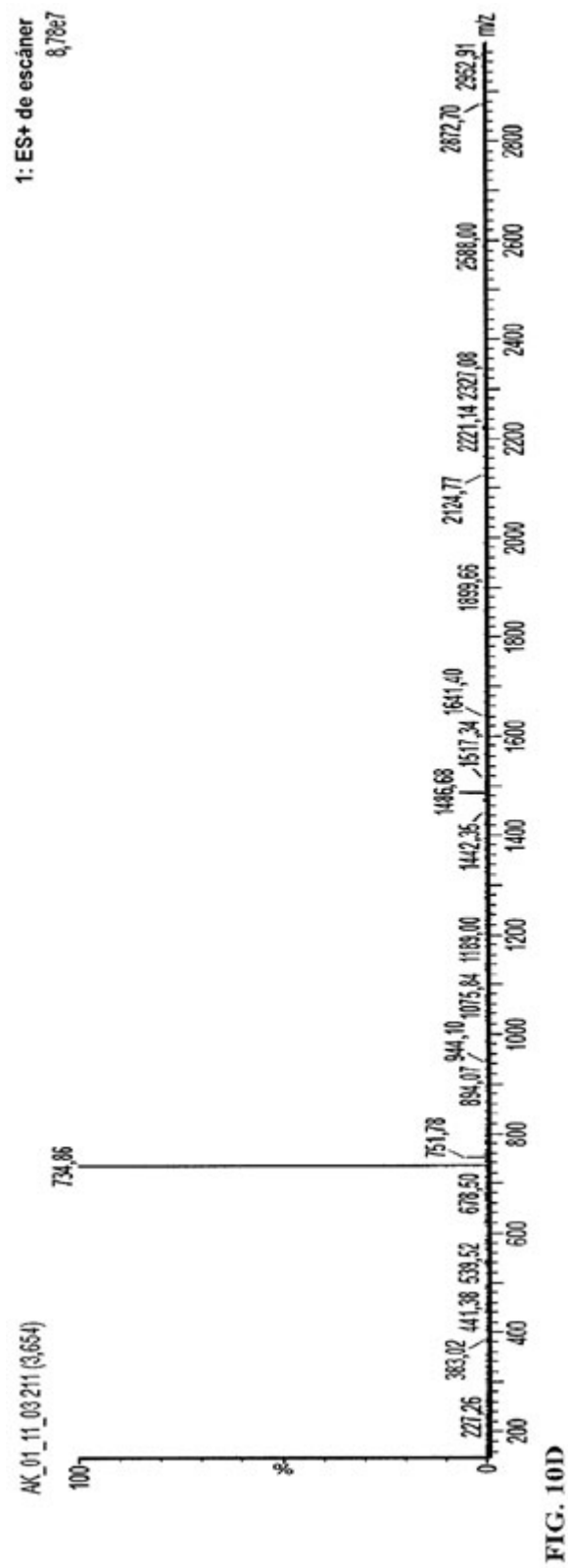
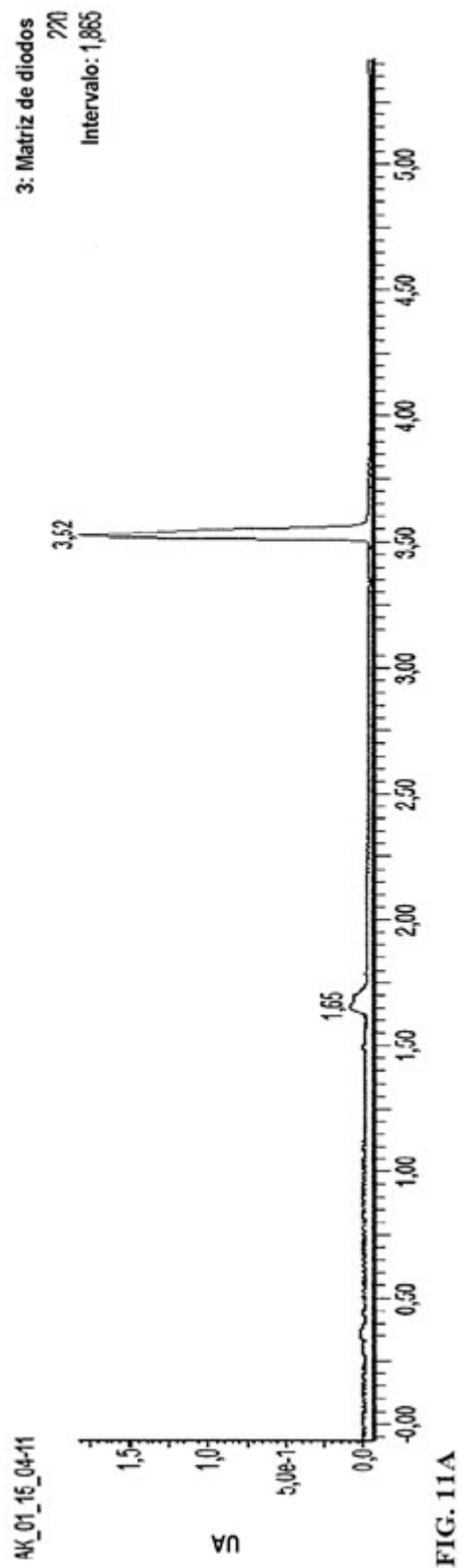
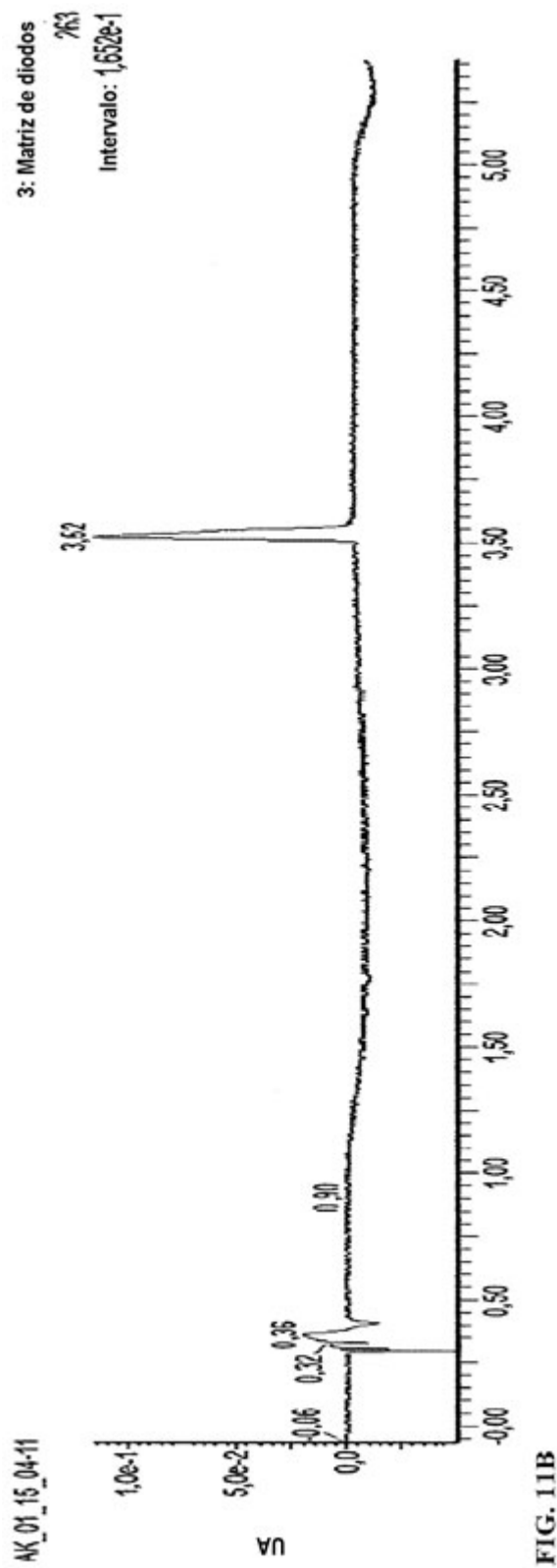
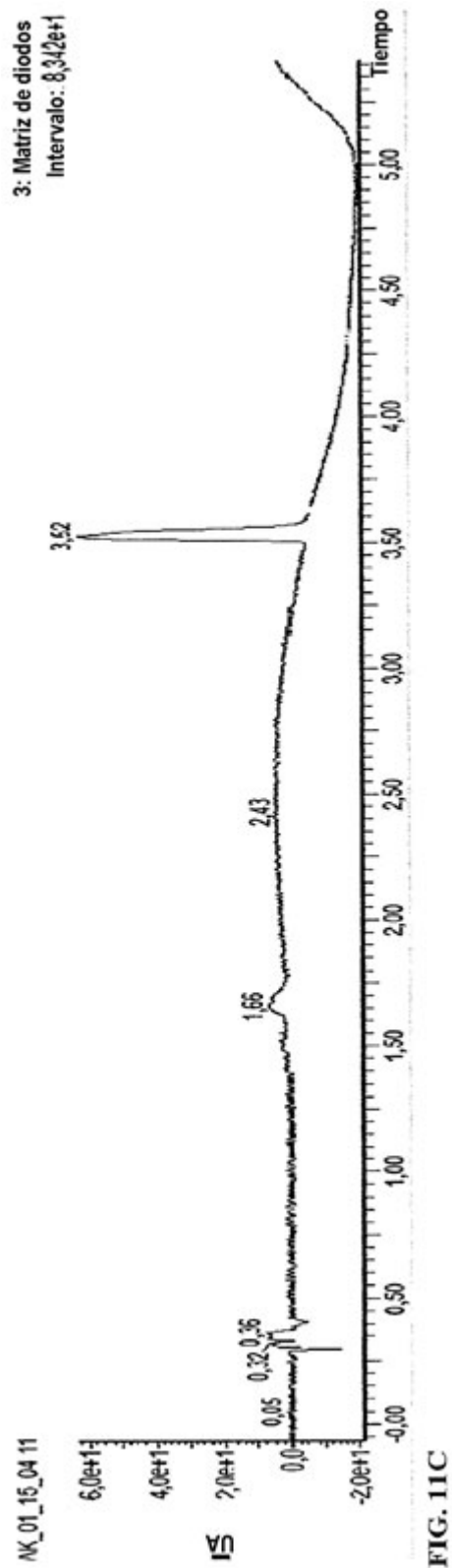


FIG. 10C









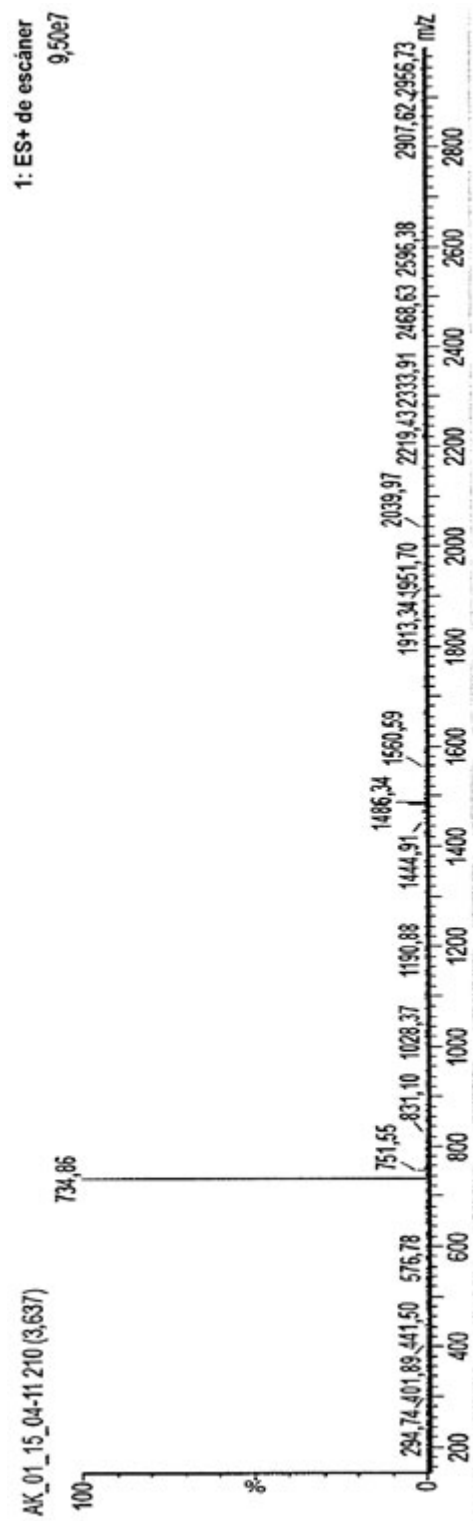
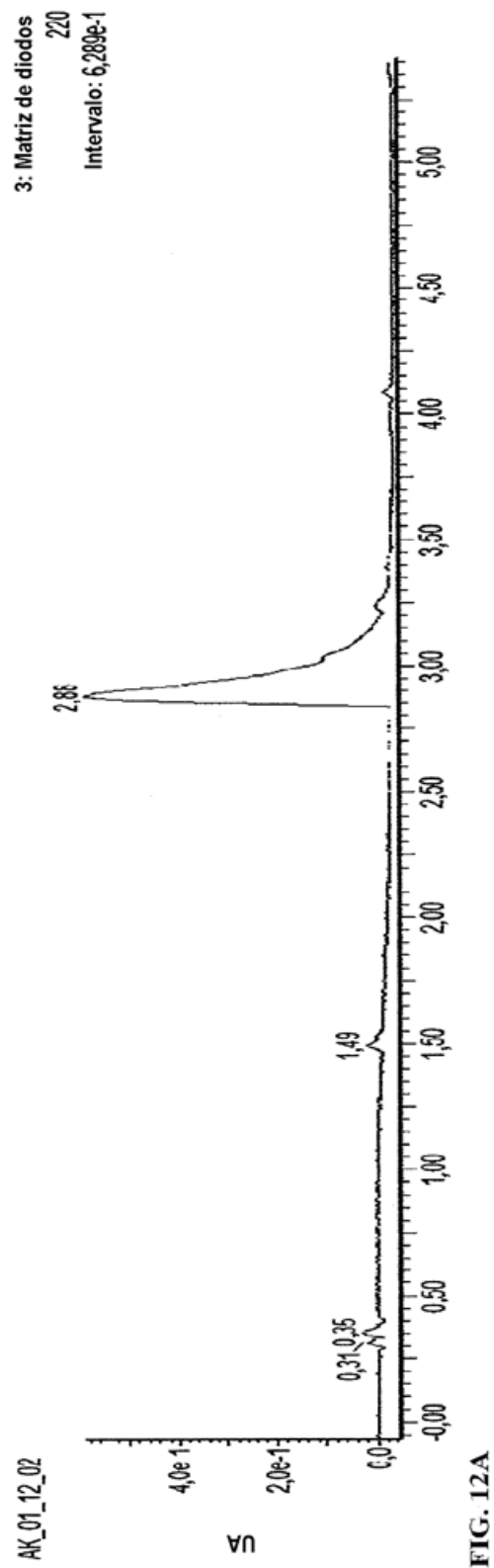
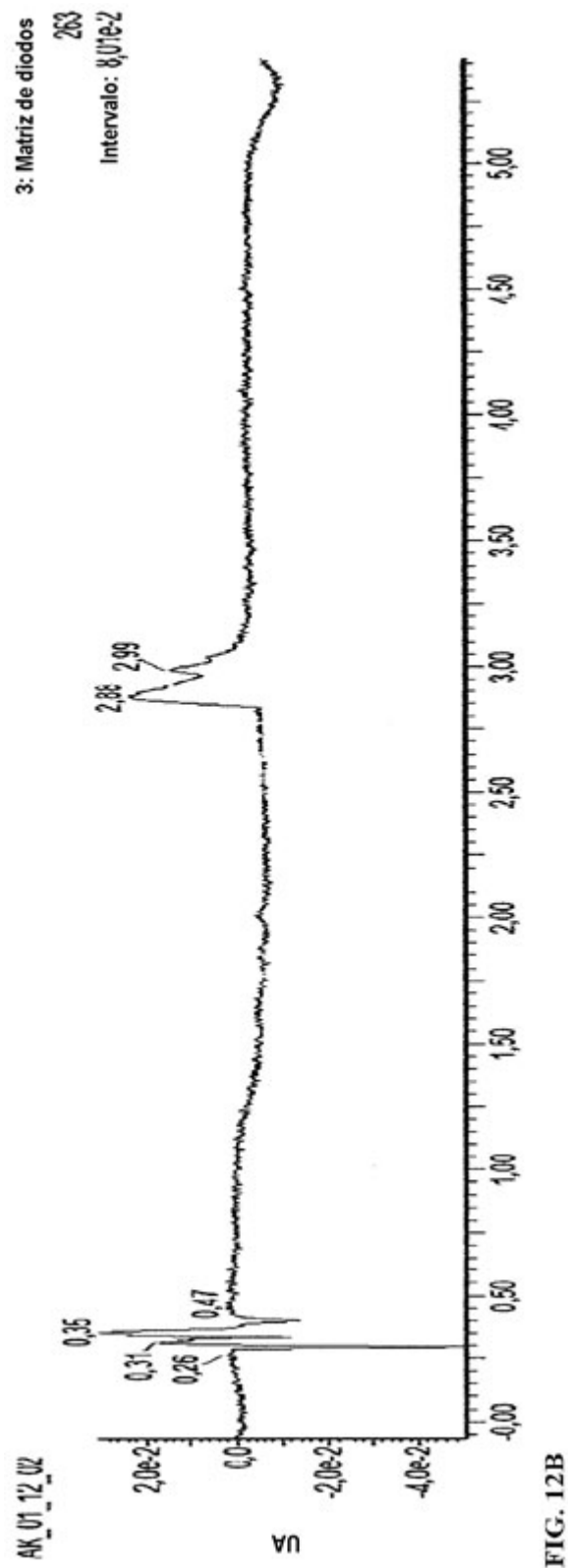
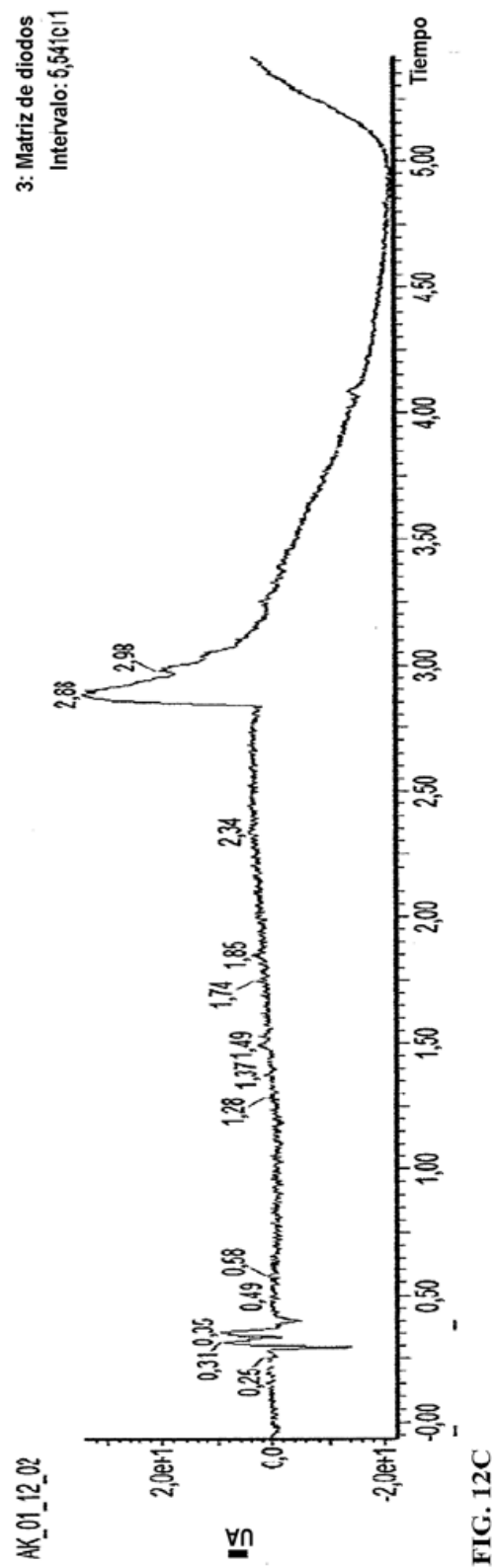
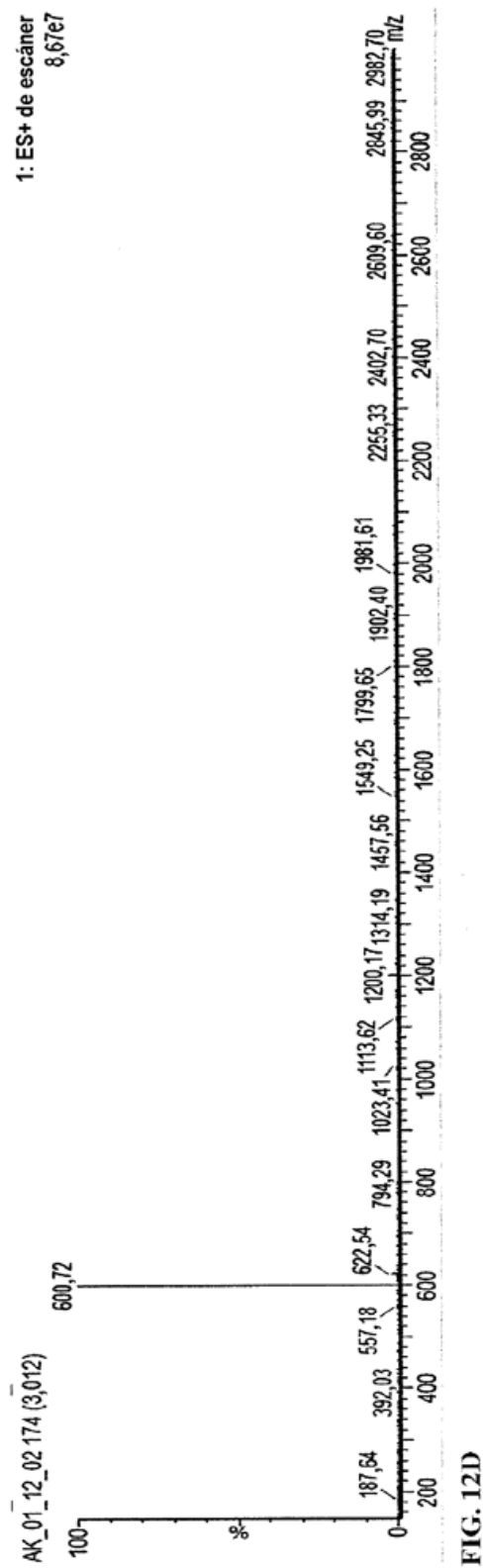


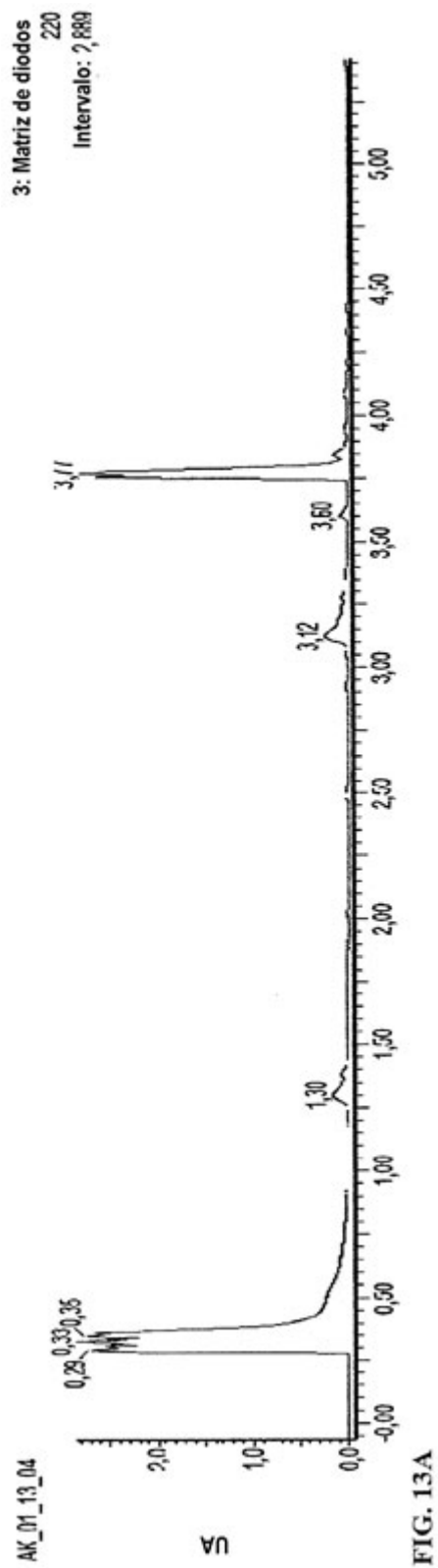
FIG. 11D

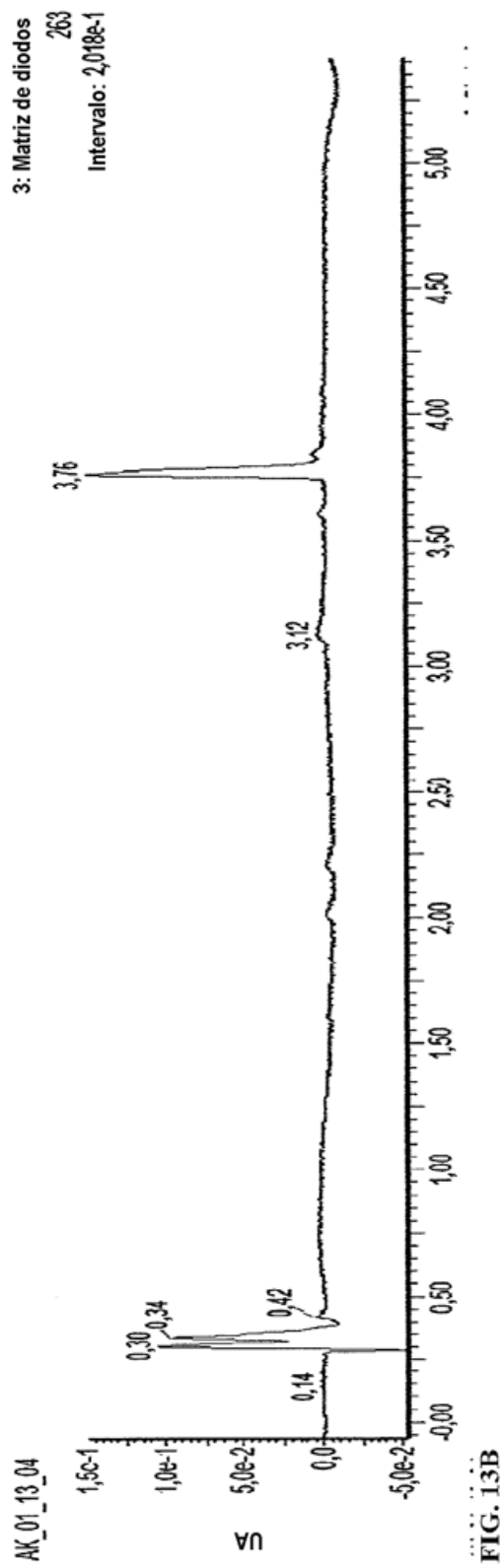


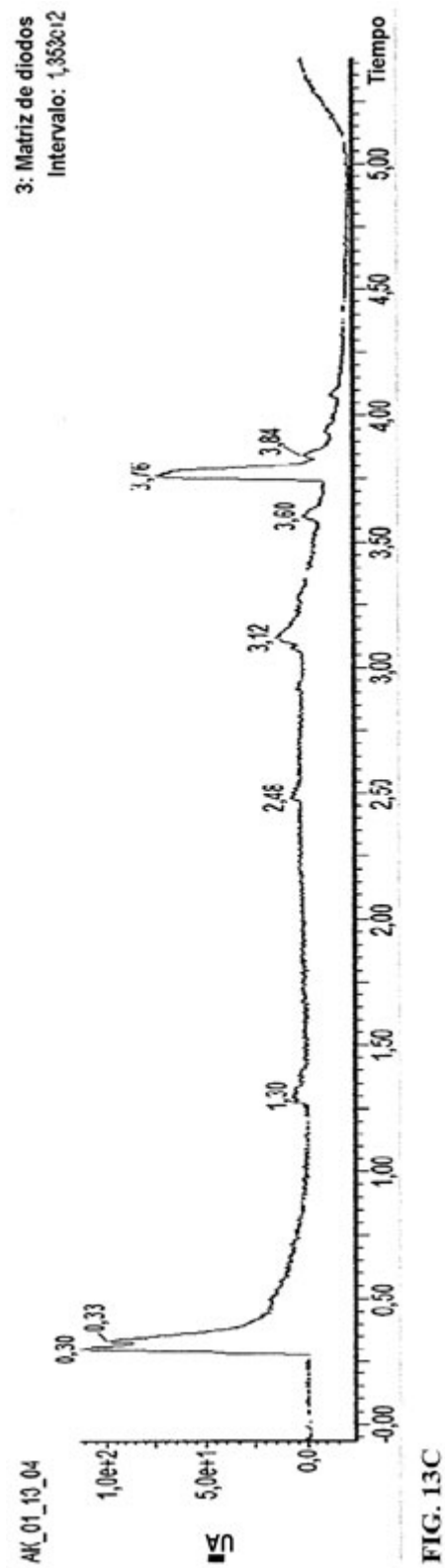


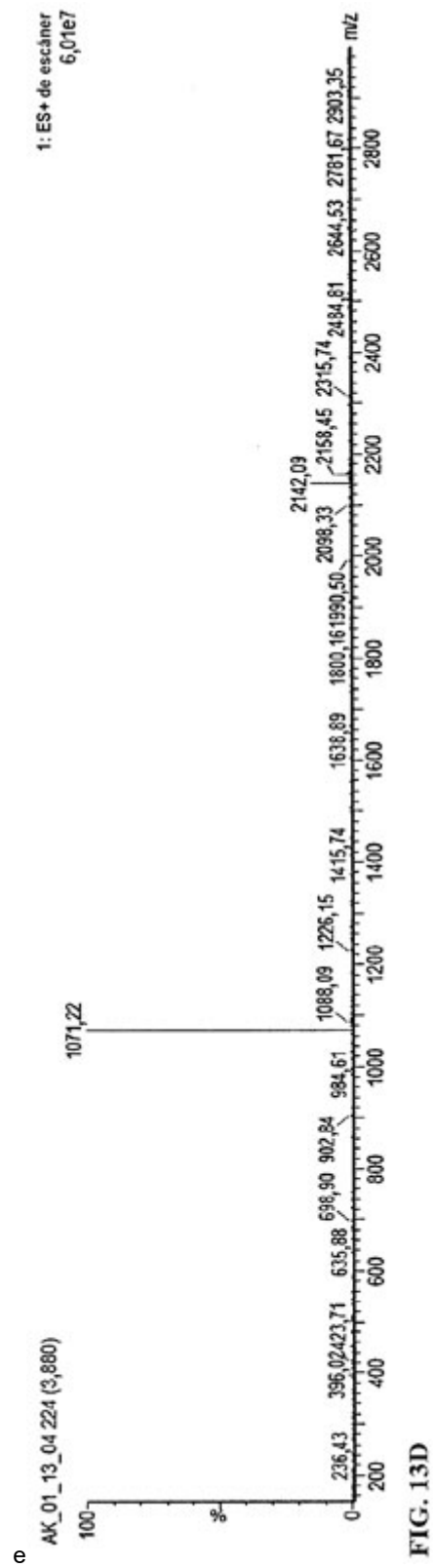


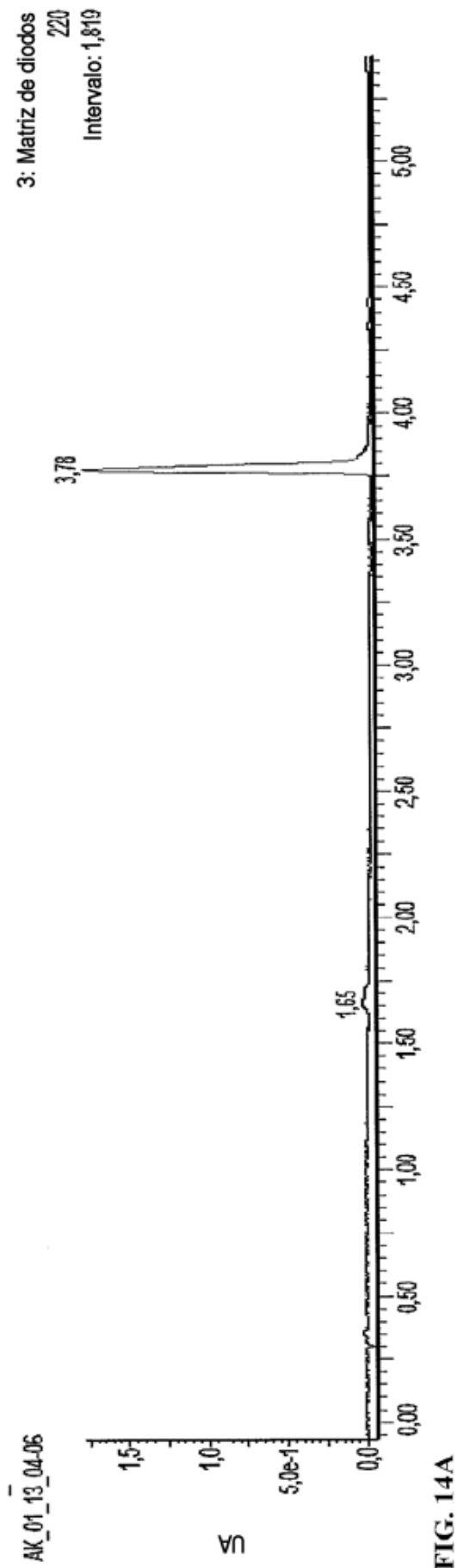


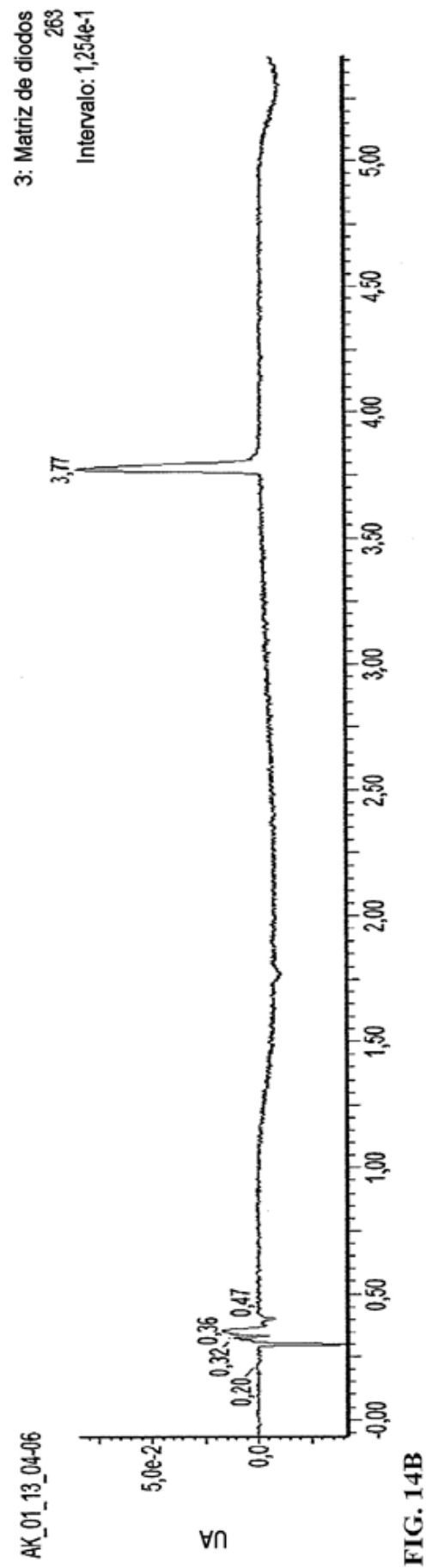












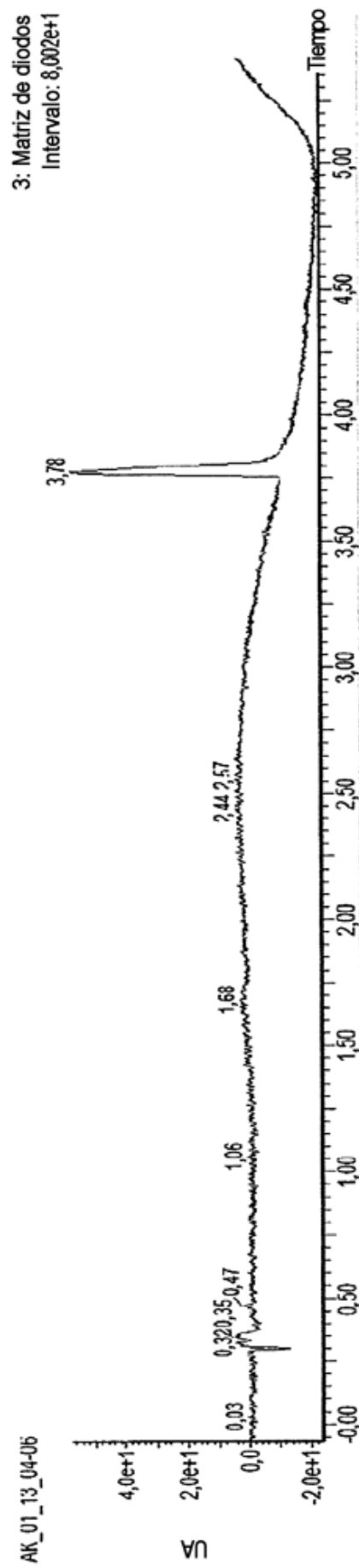
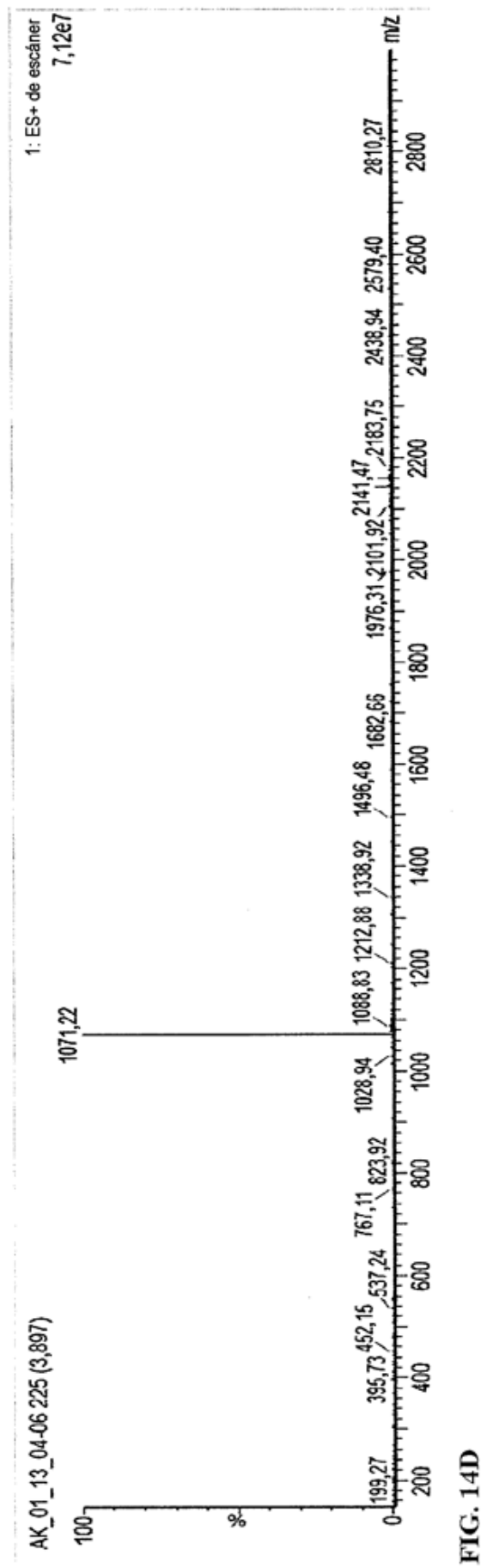
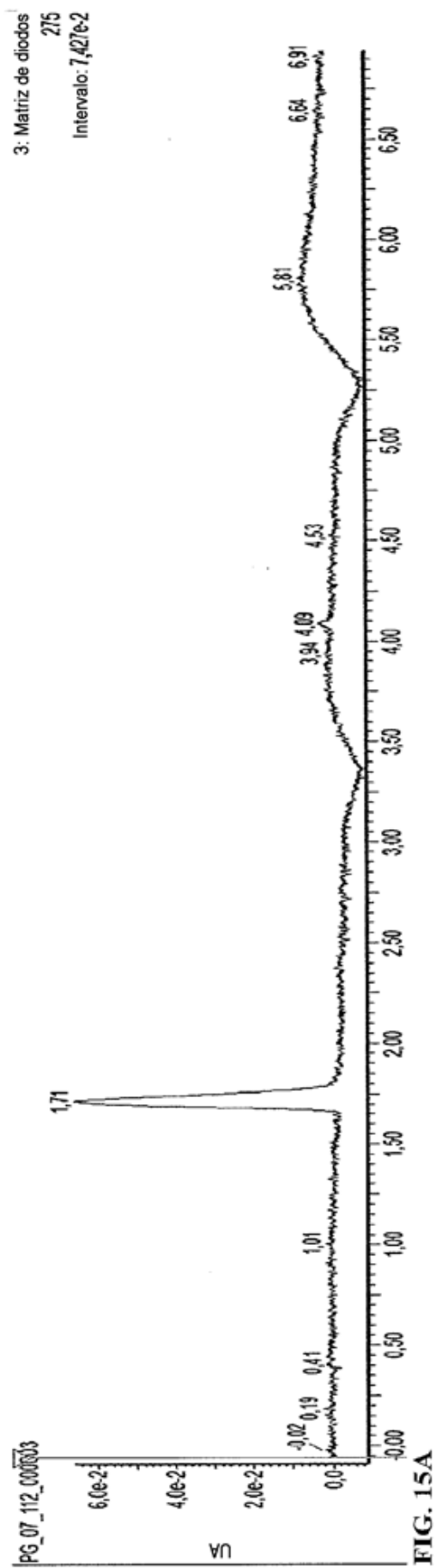
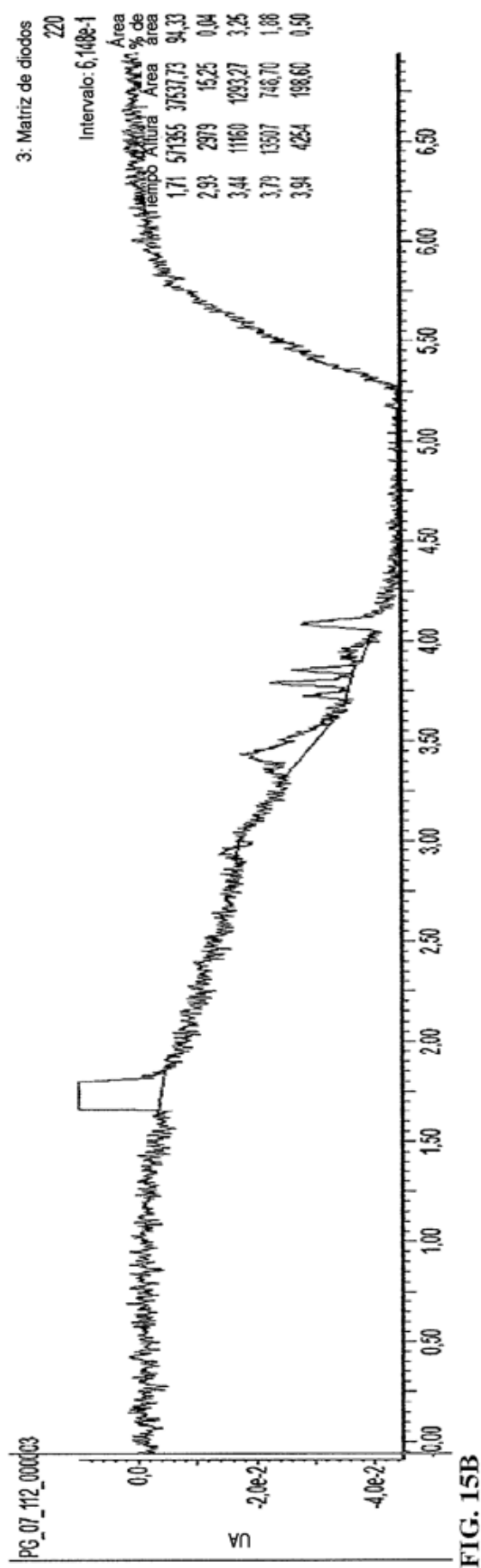
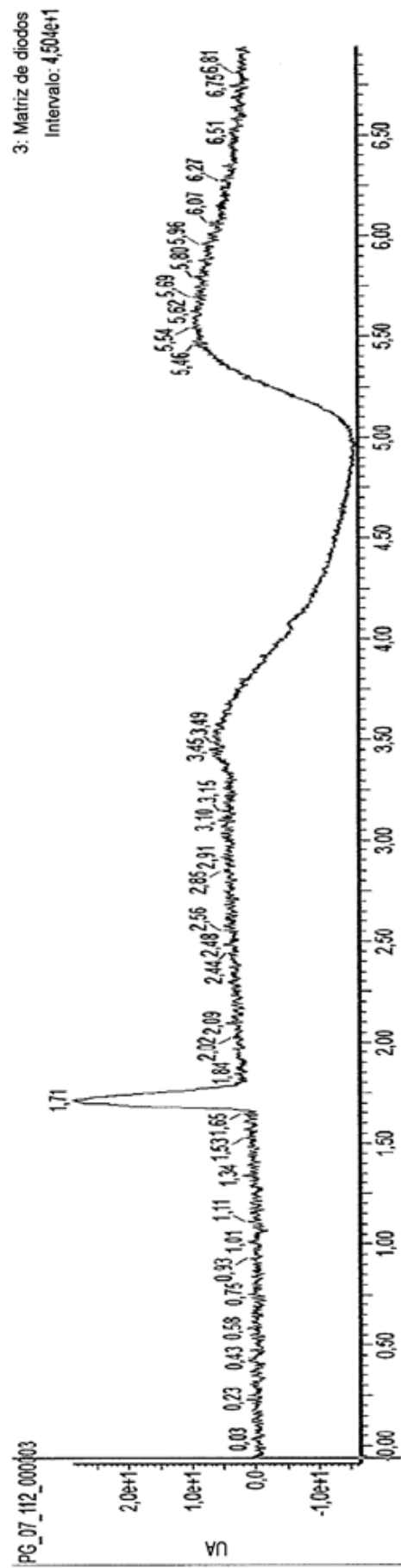


FIG. 14C









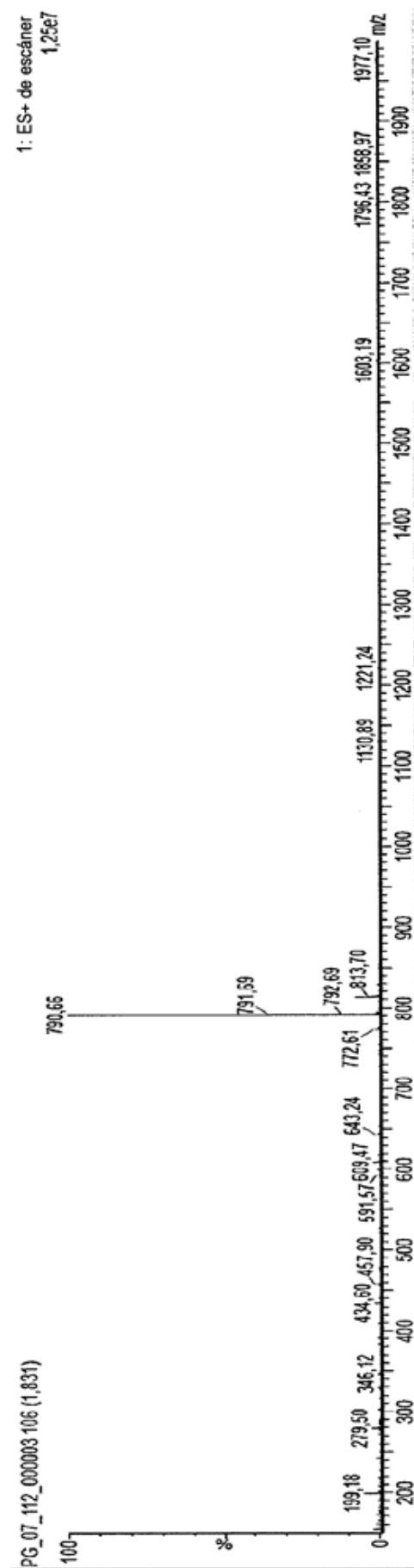
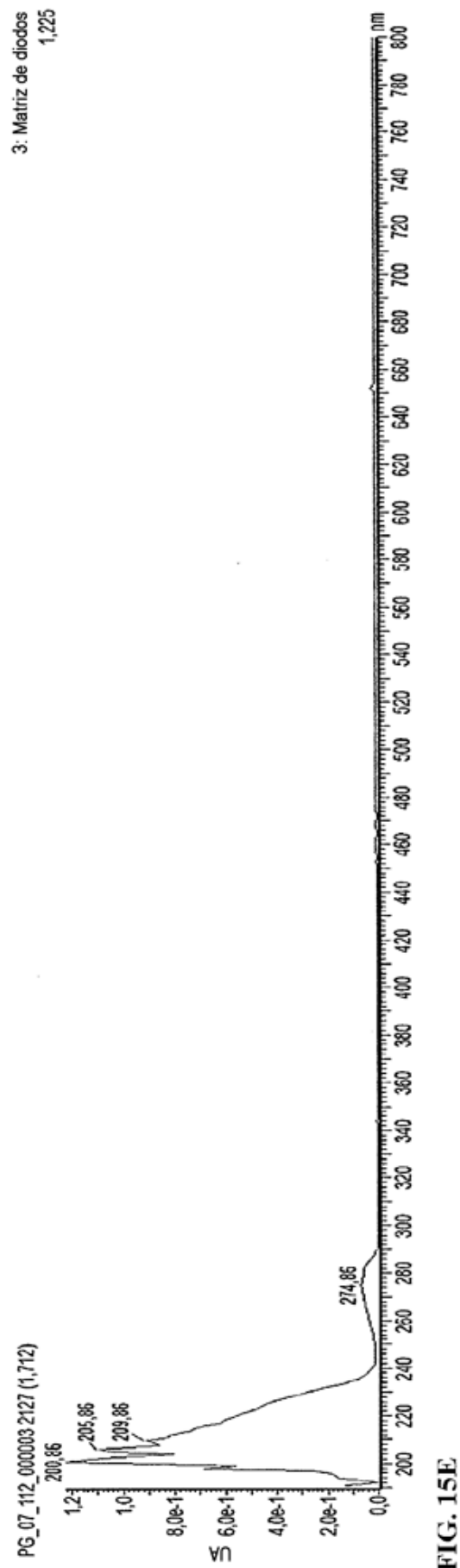


FIG. 15D



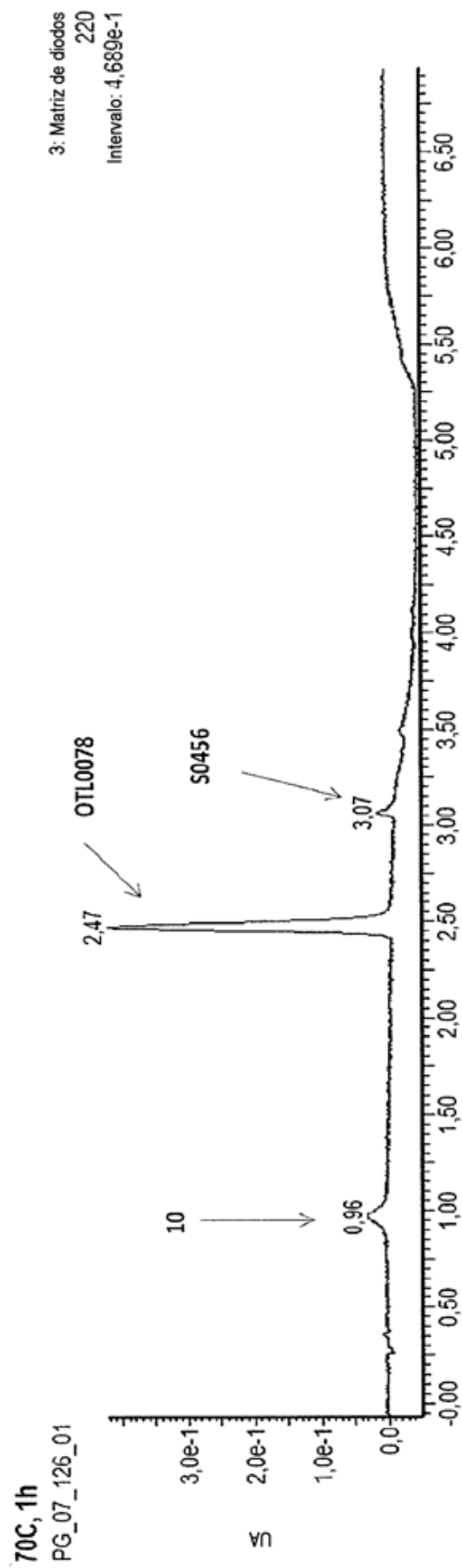


FIG. 16A

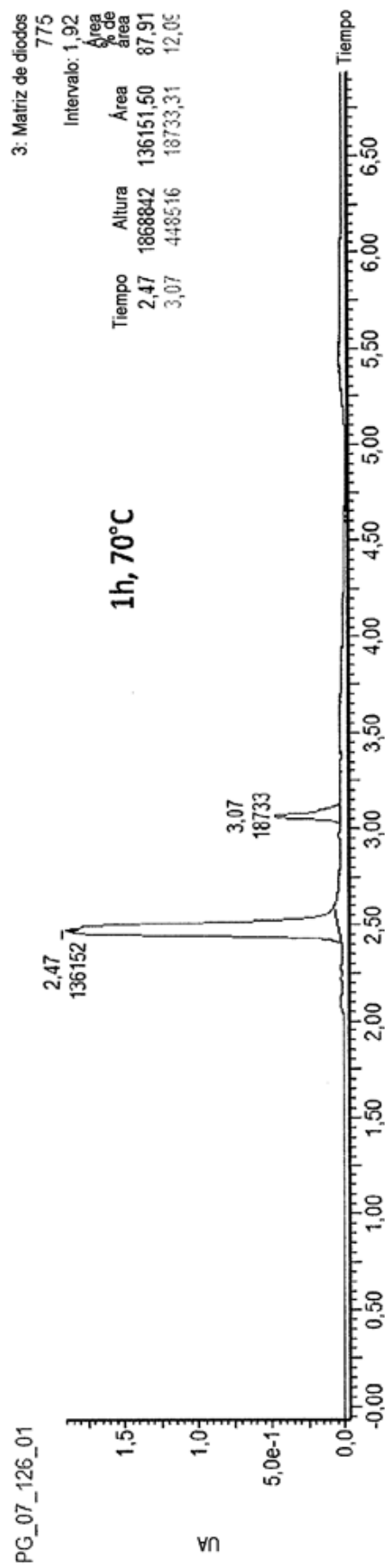
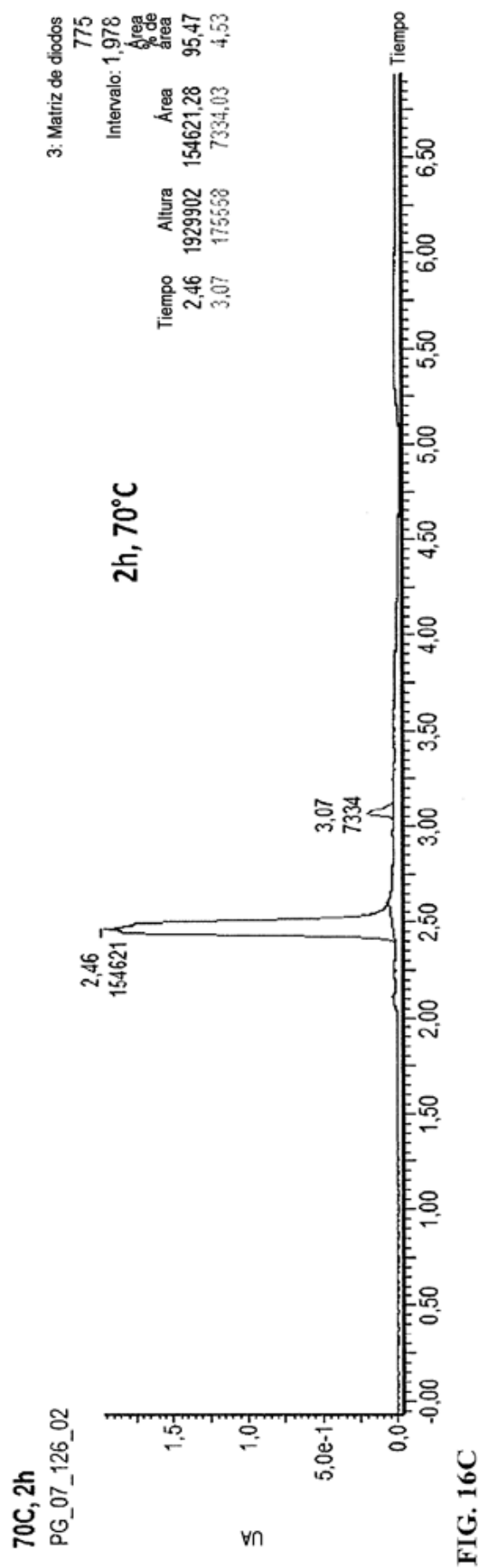
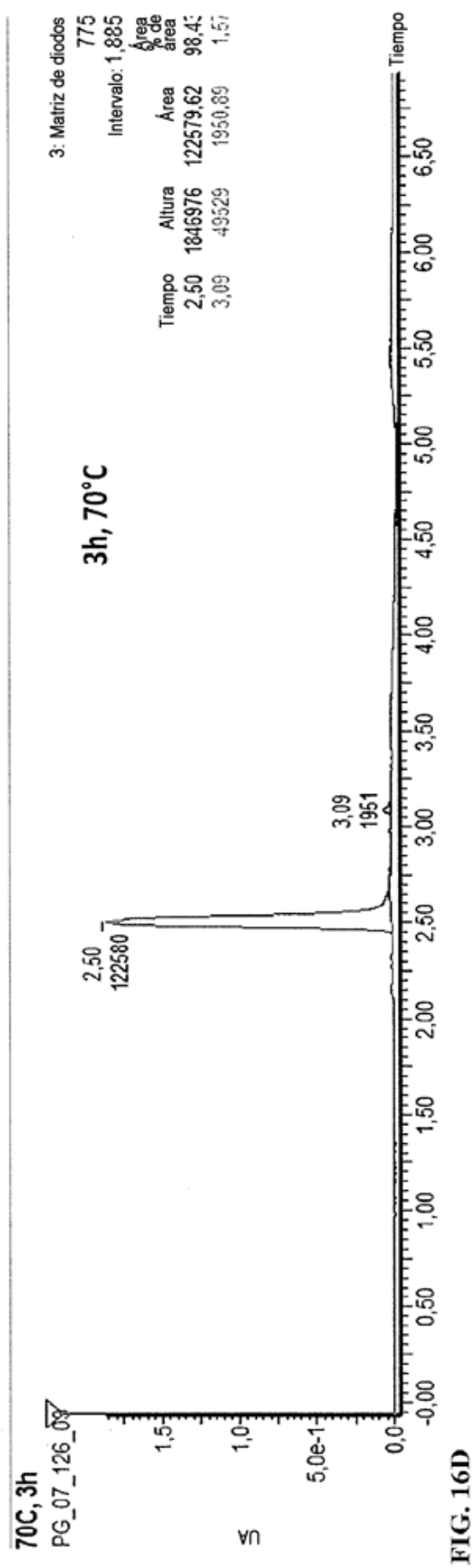
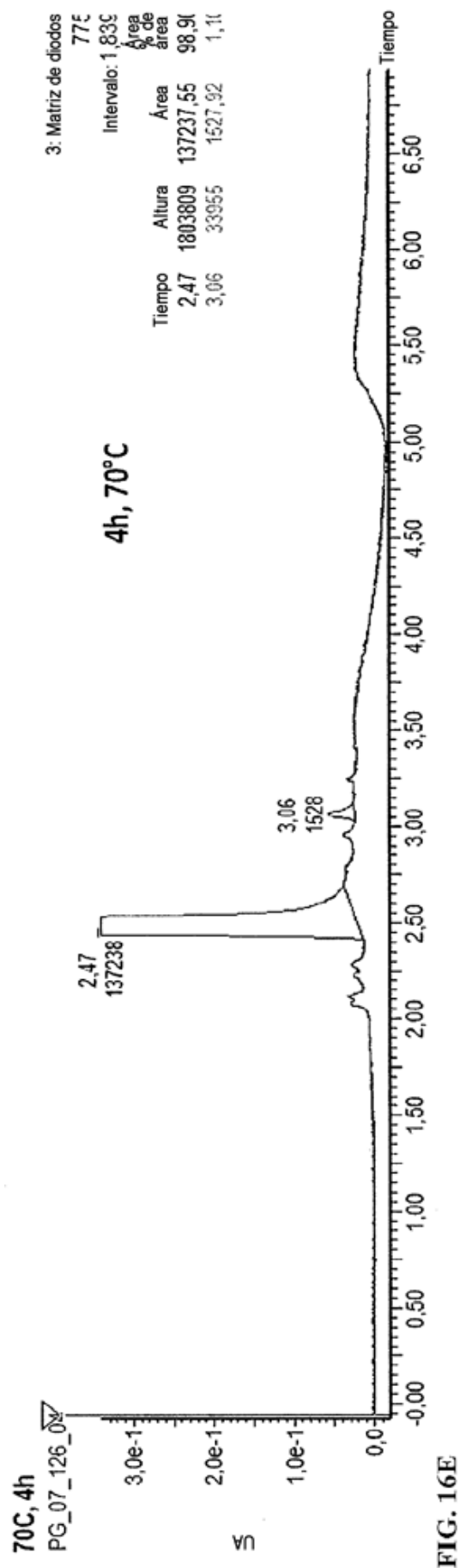


FIG. 16B







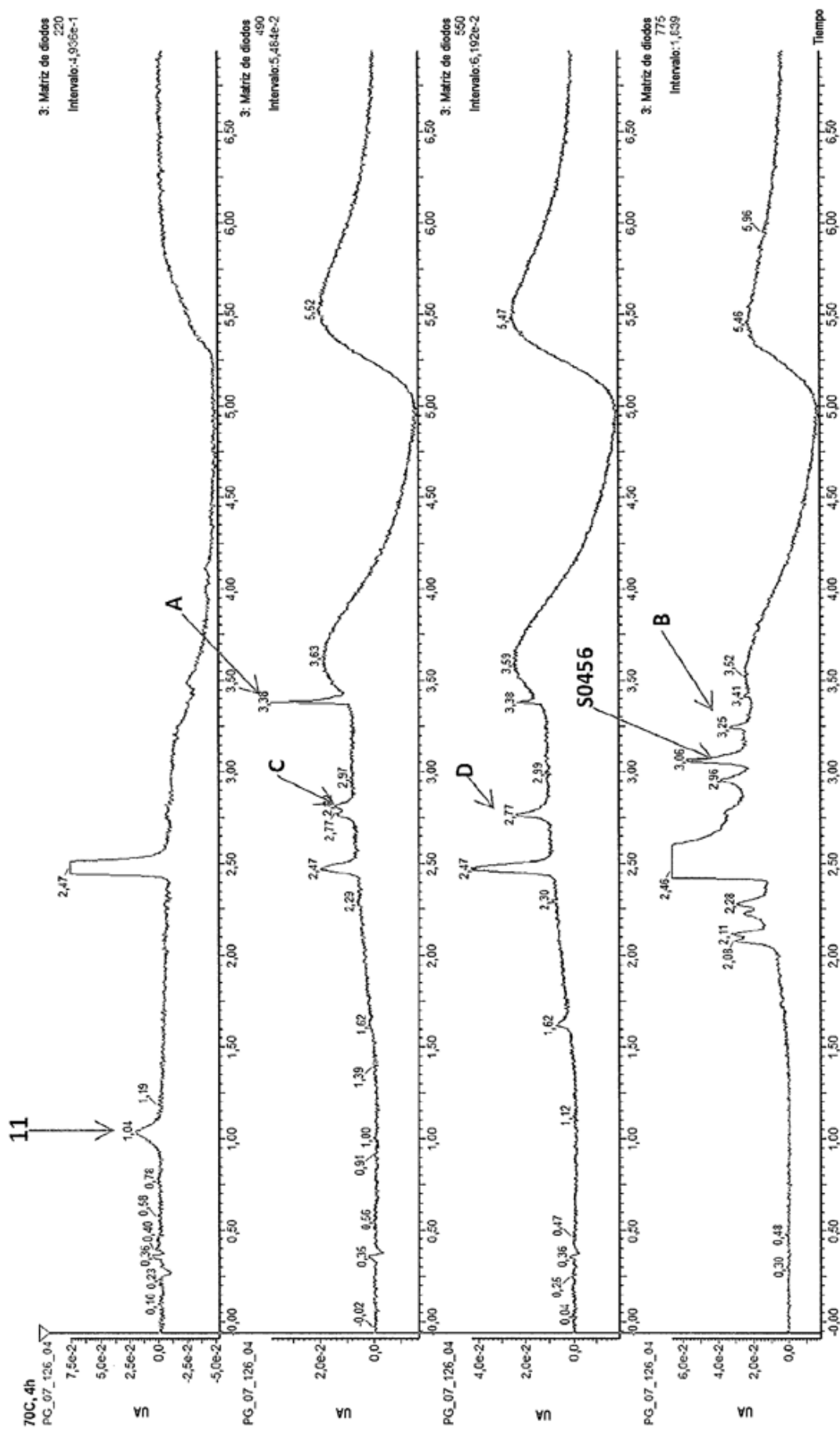
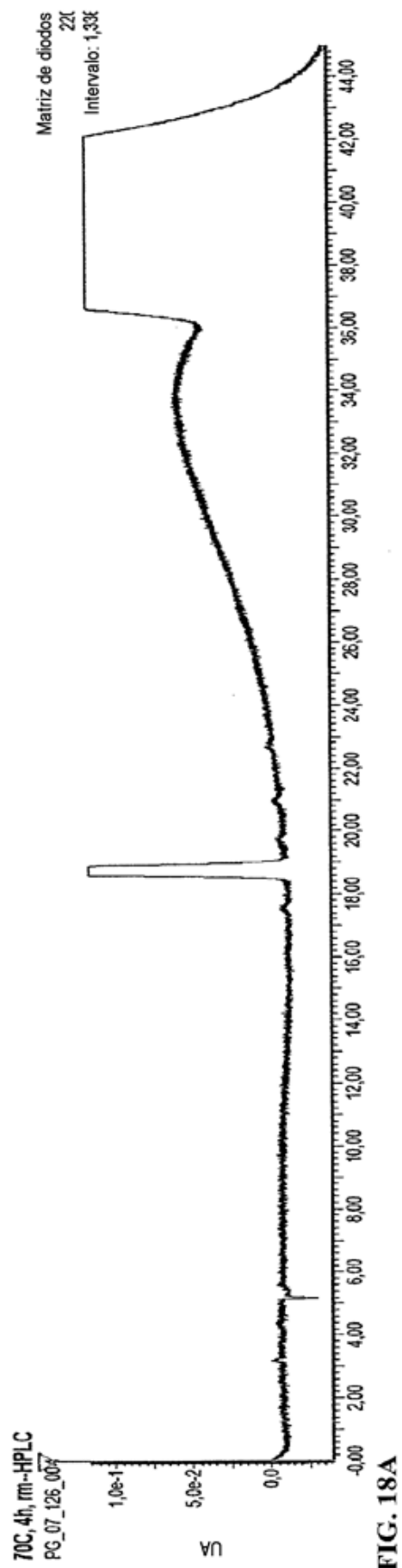


FIG. 17



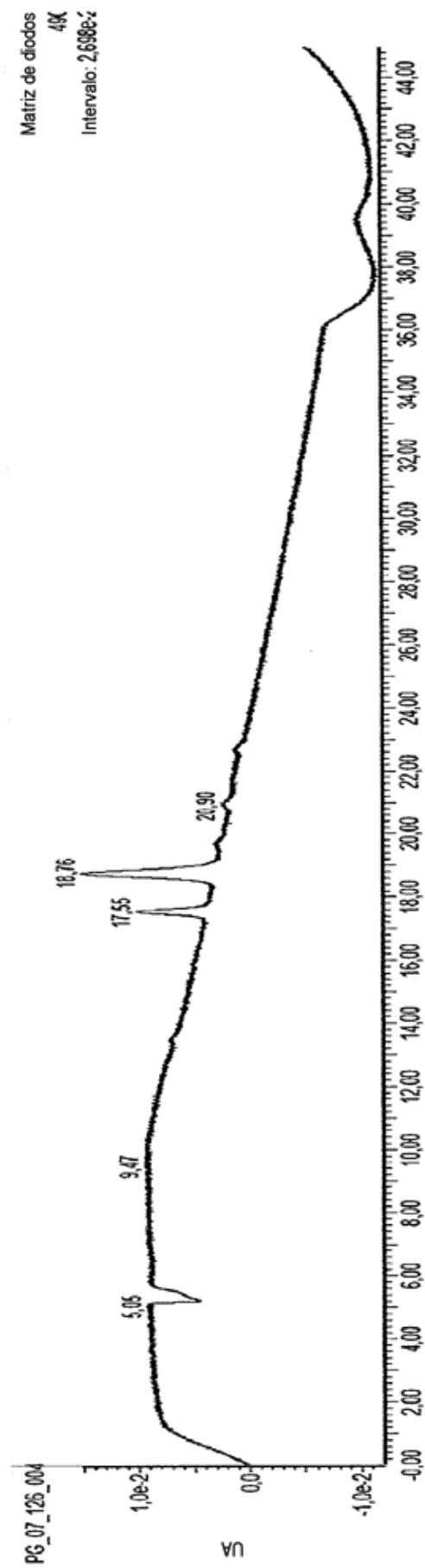
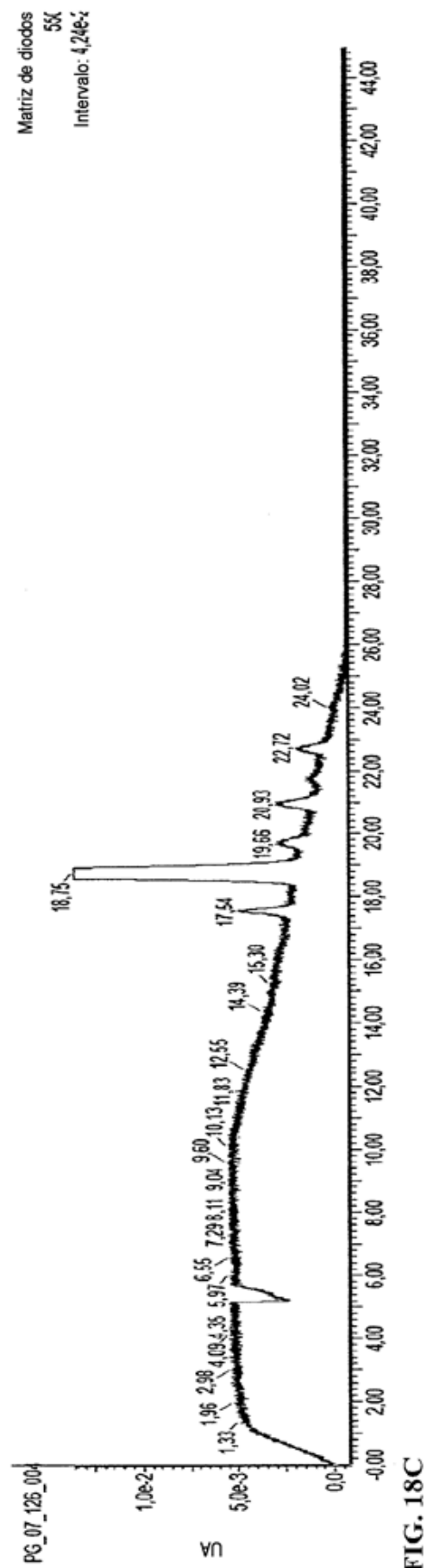
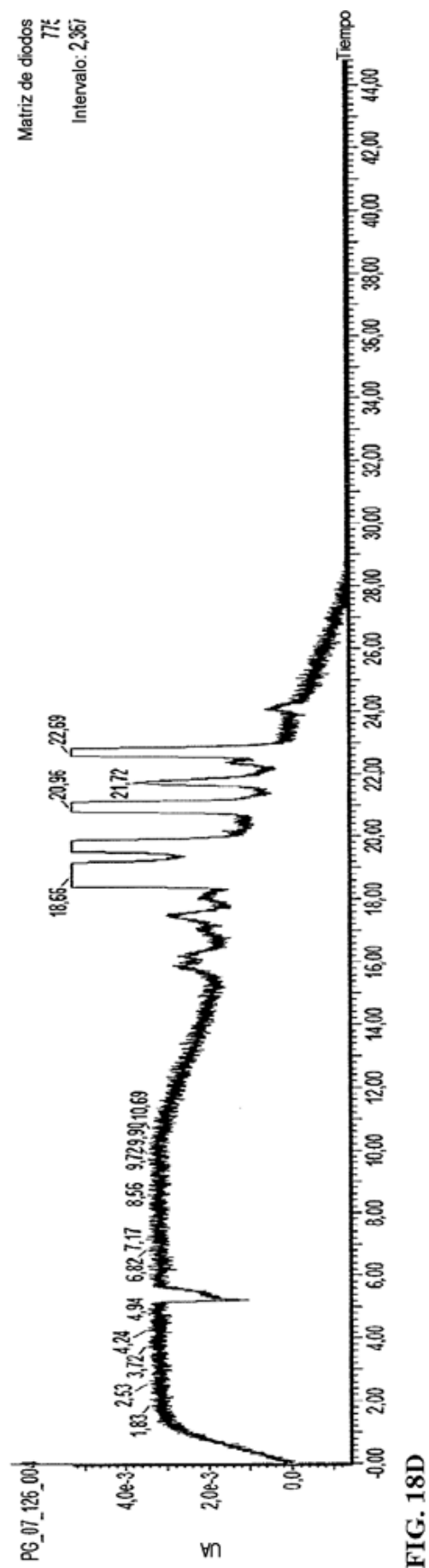


FIG. 18B





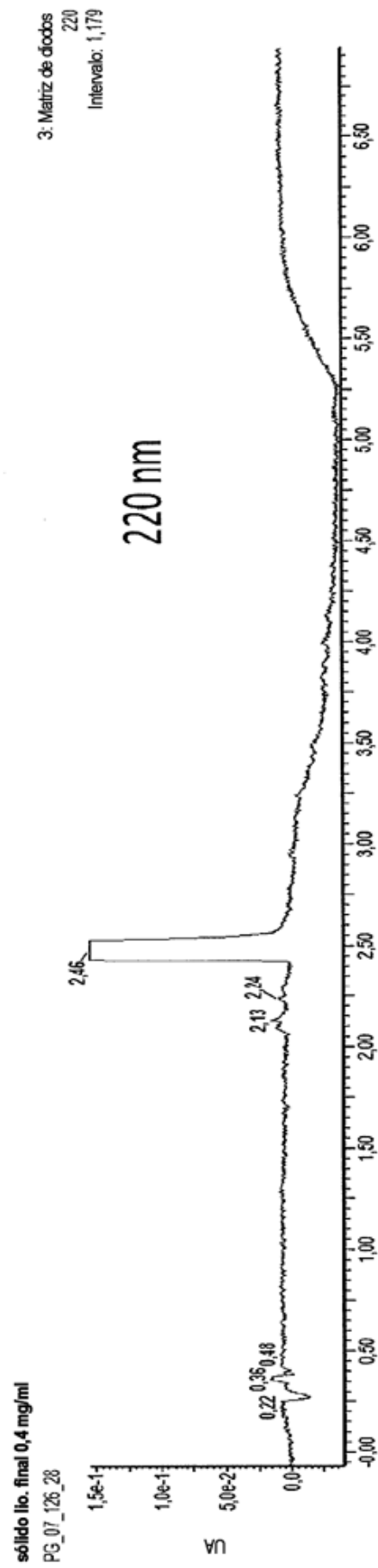
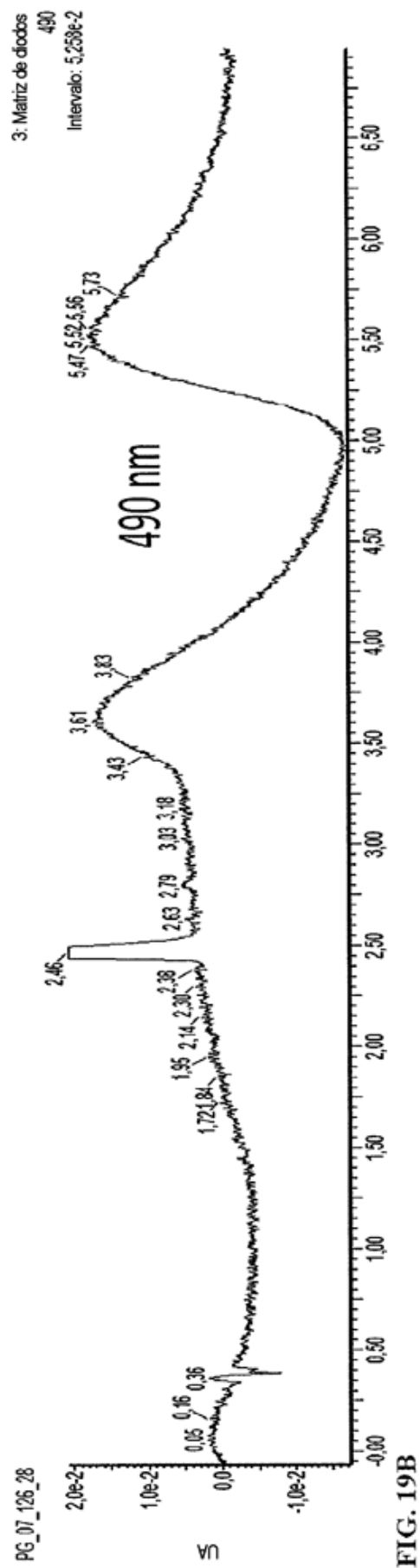
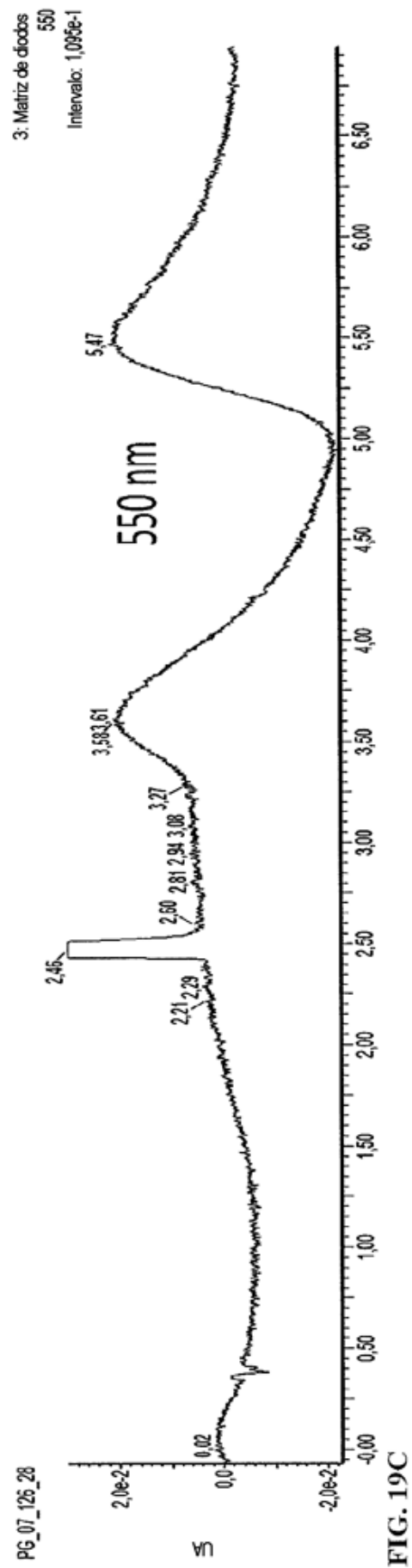
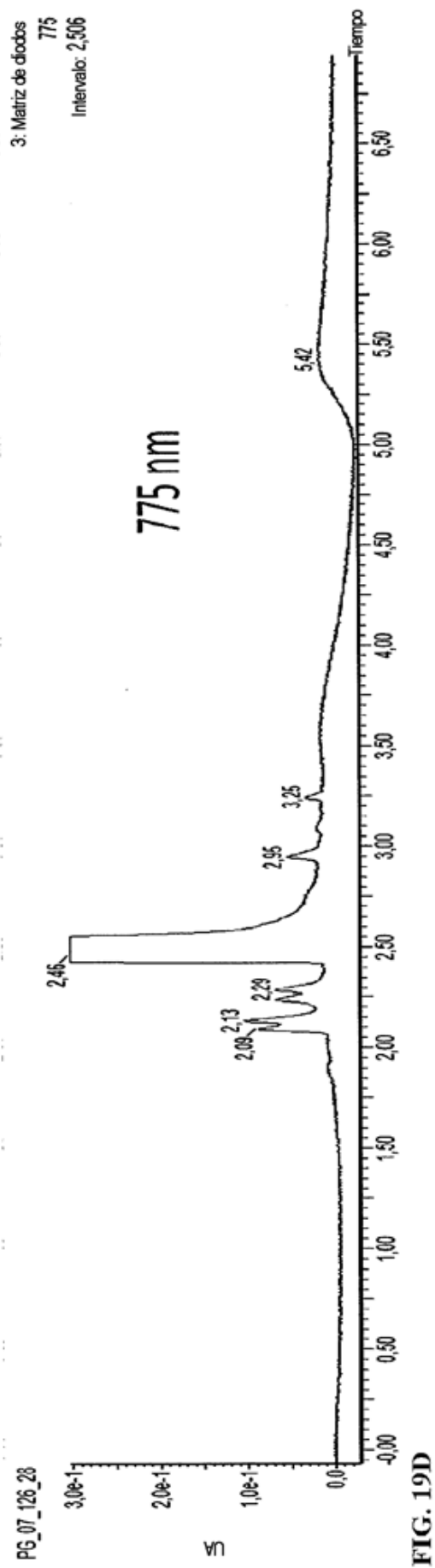


FIG. 19A







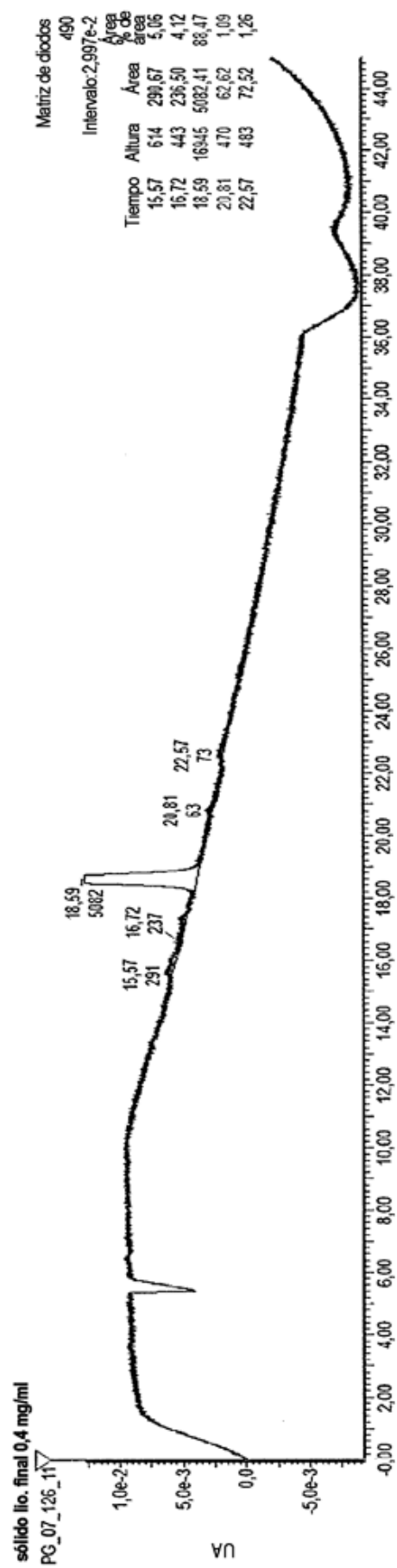
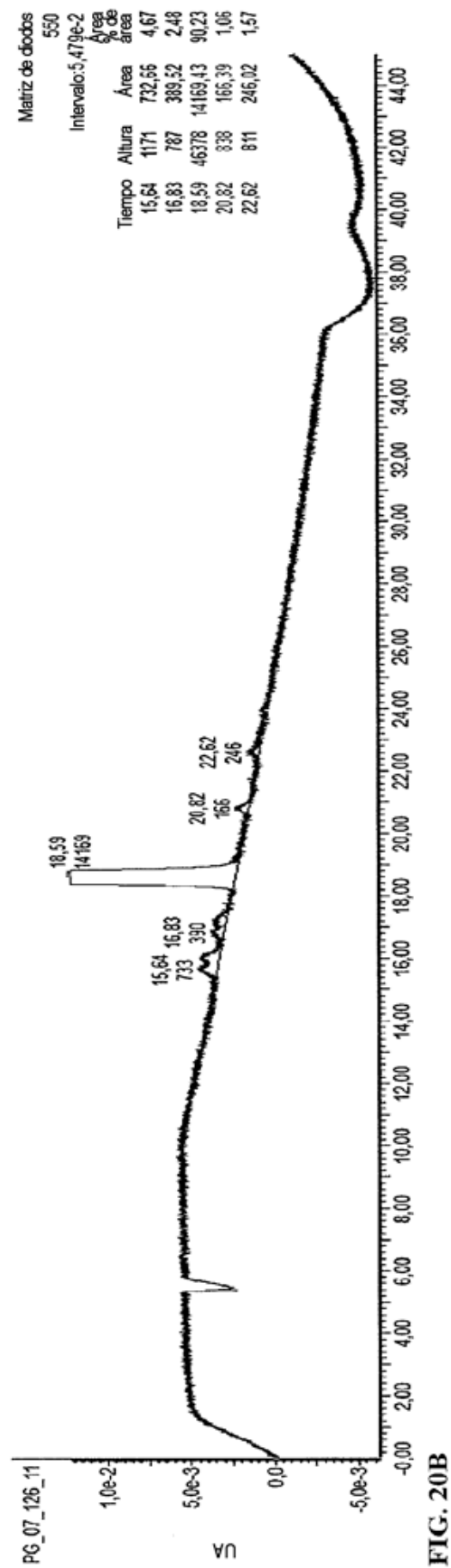


FIG. 20A



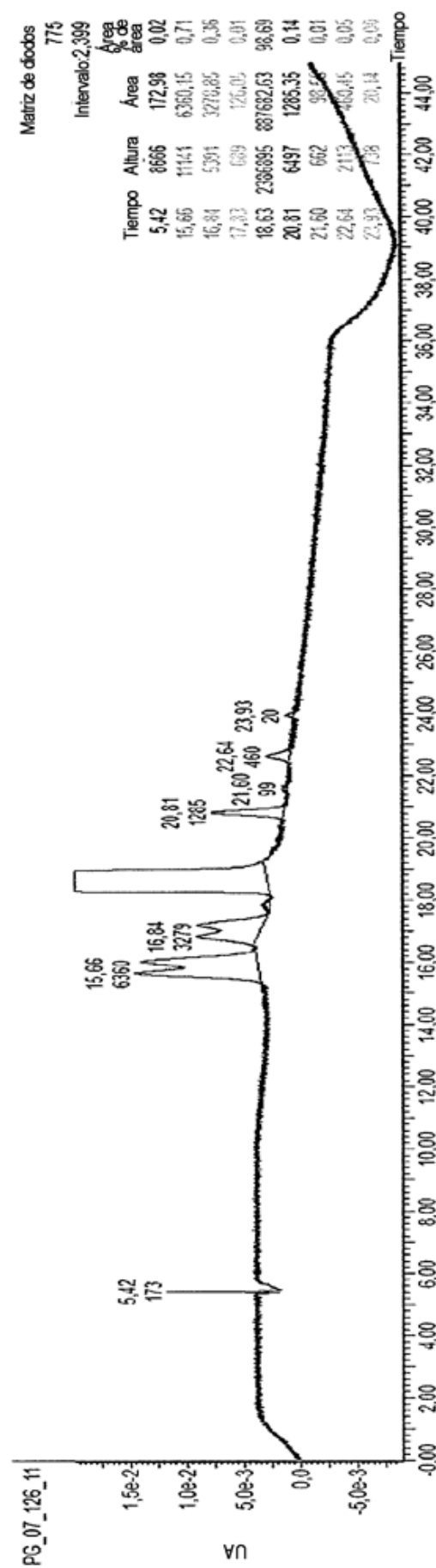
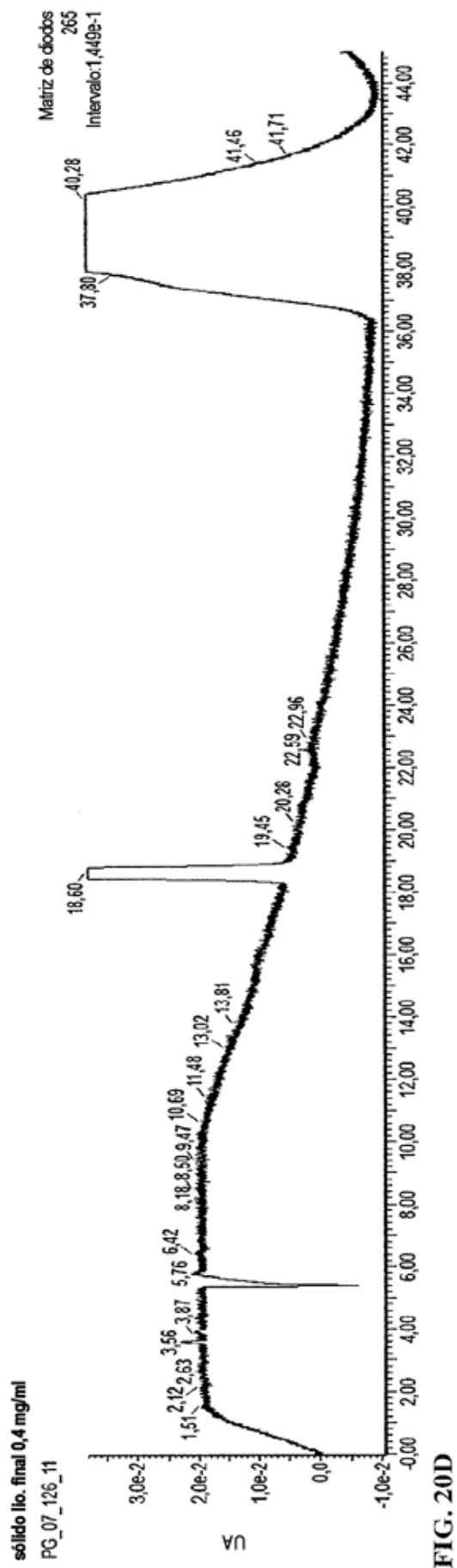
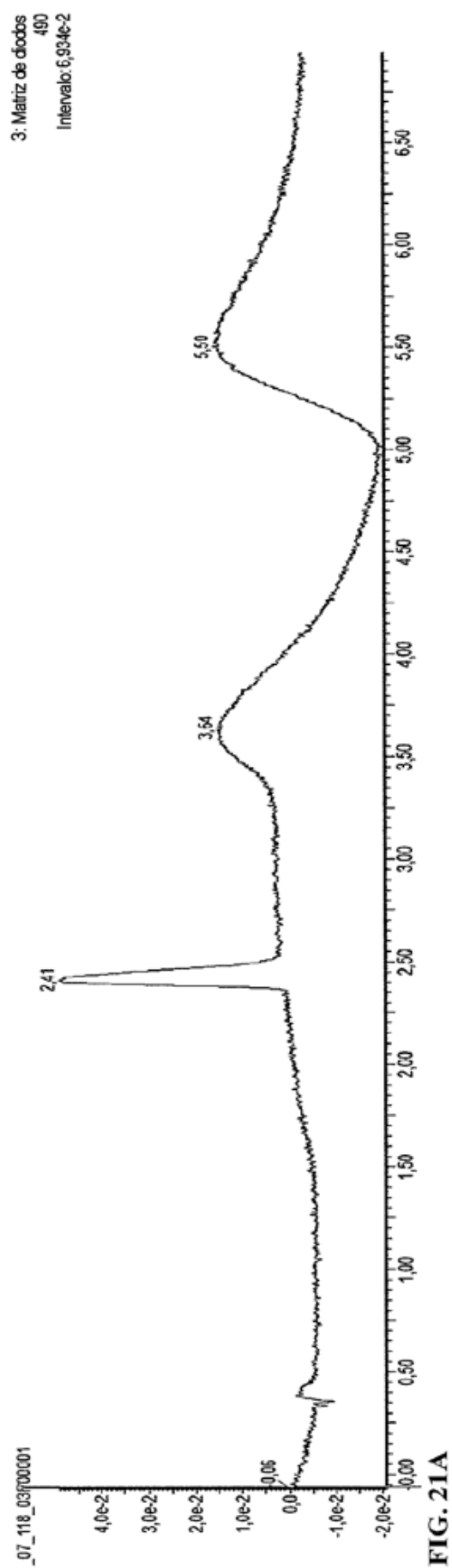


FIG. 20C





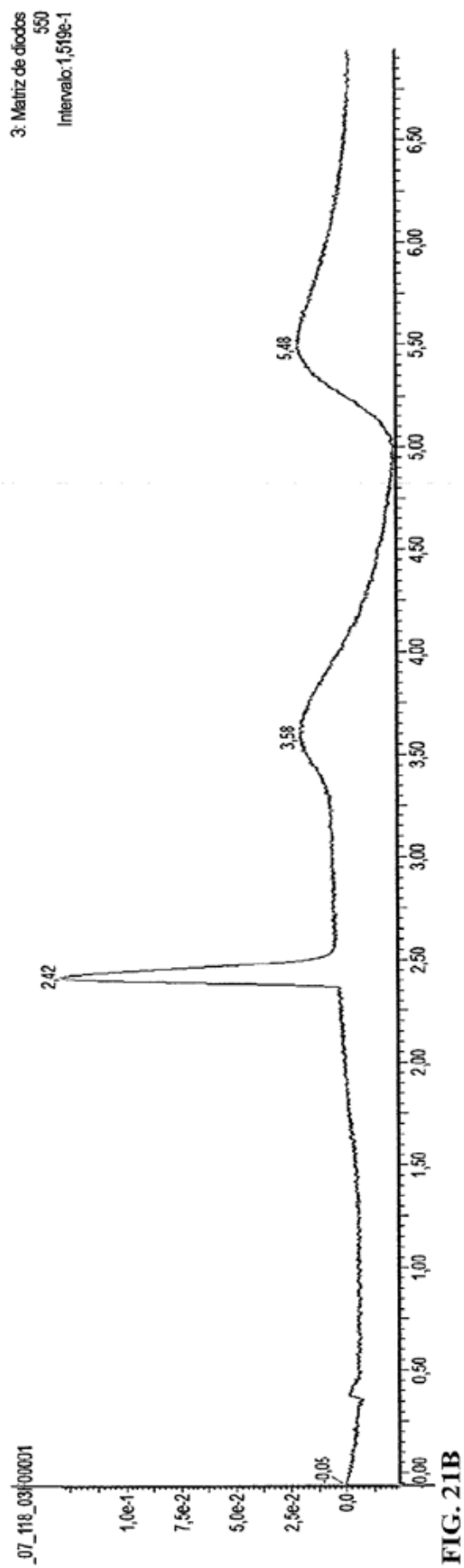
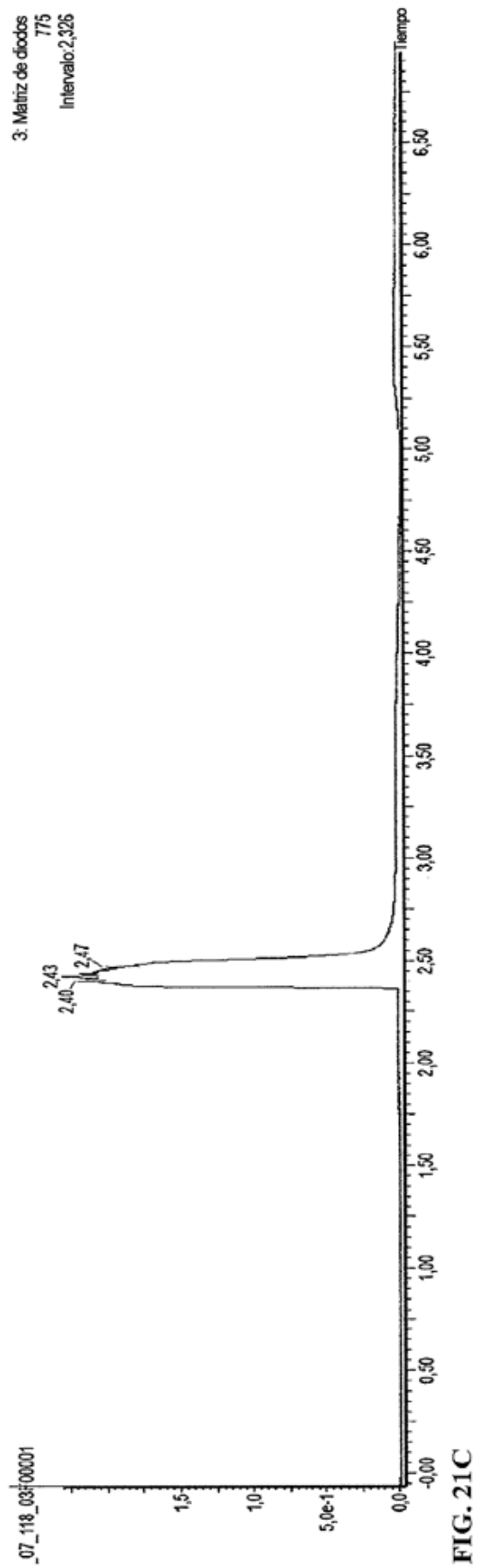
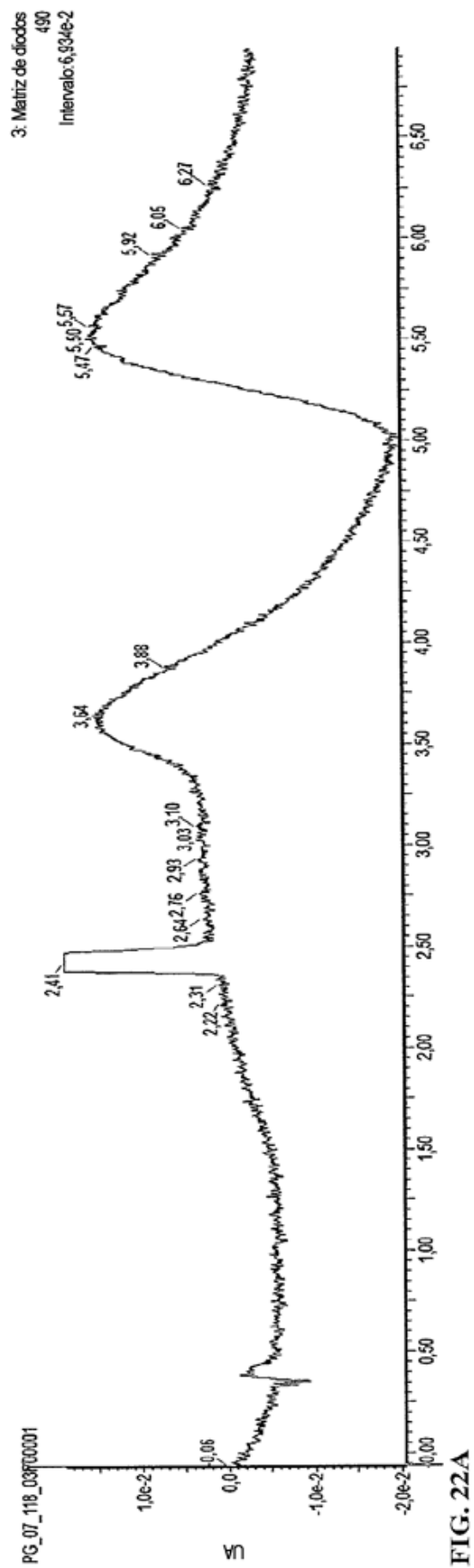
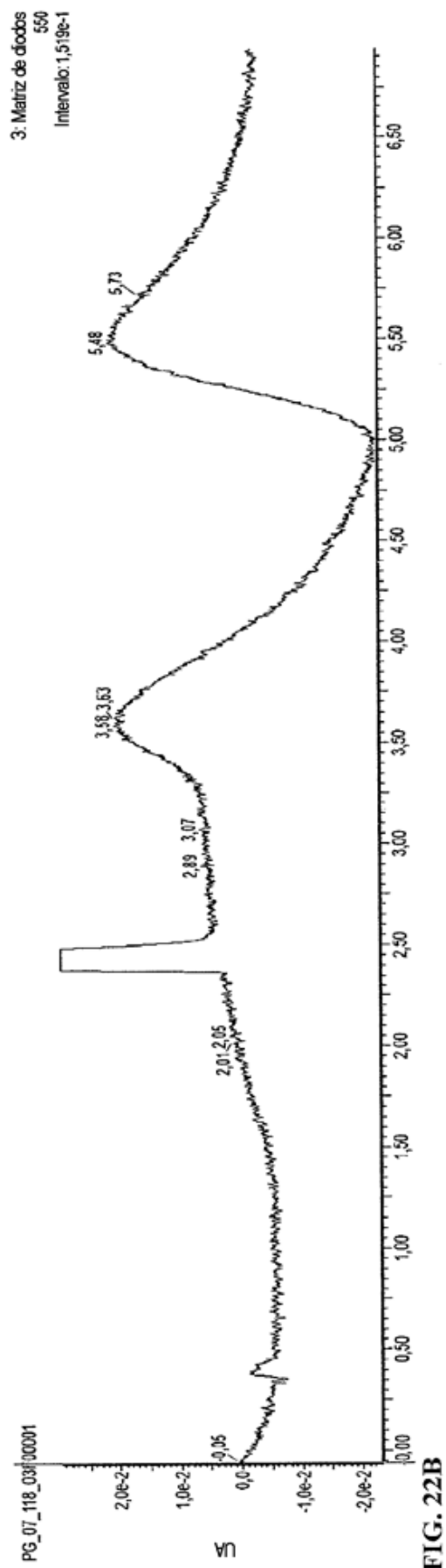
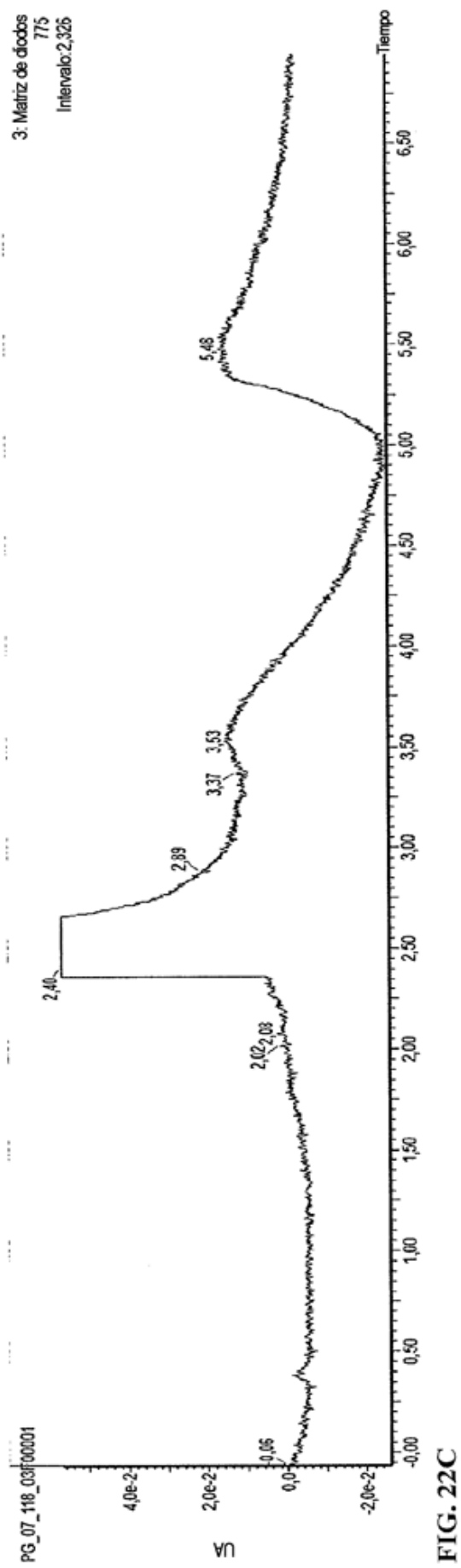


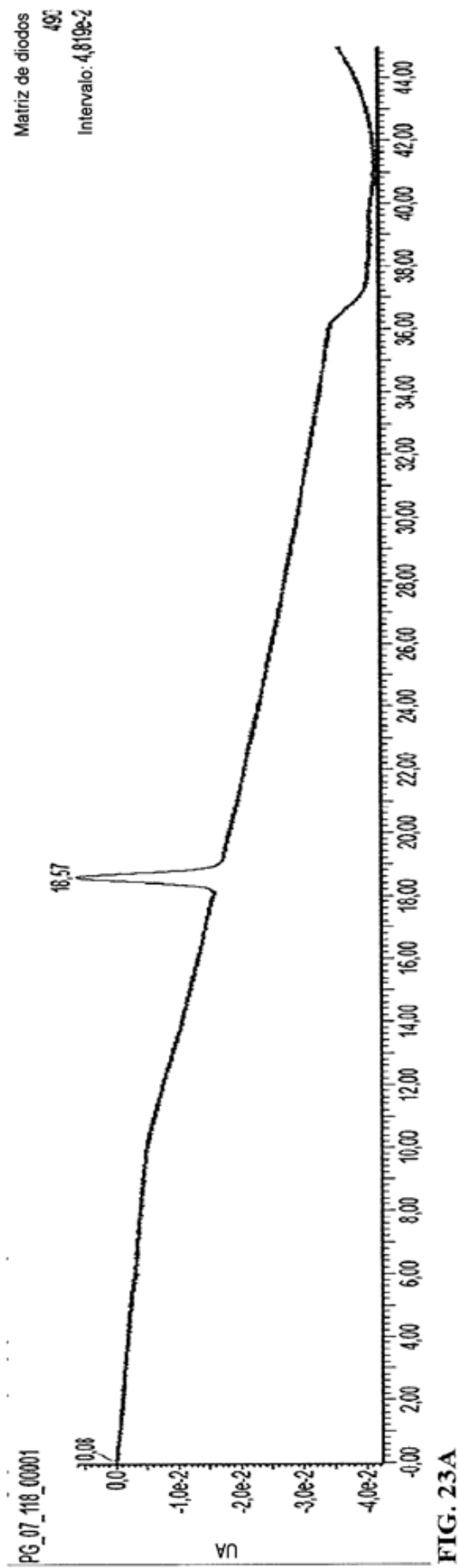
FIG. 21B

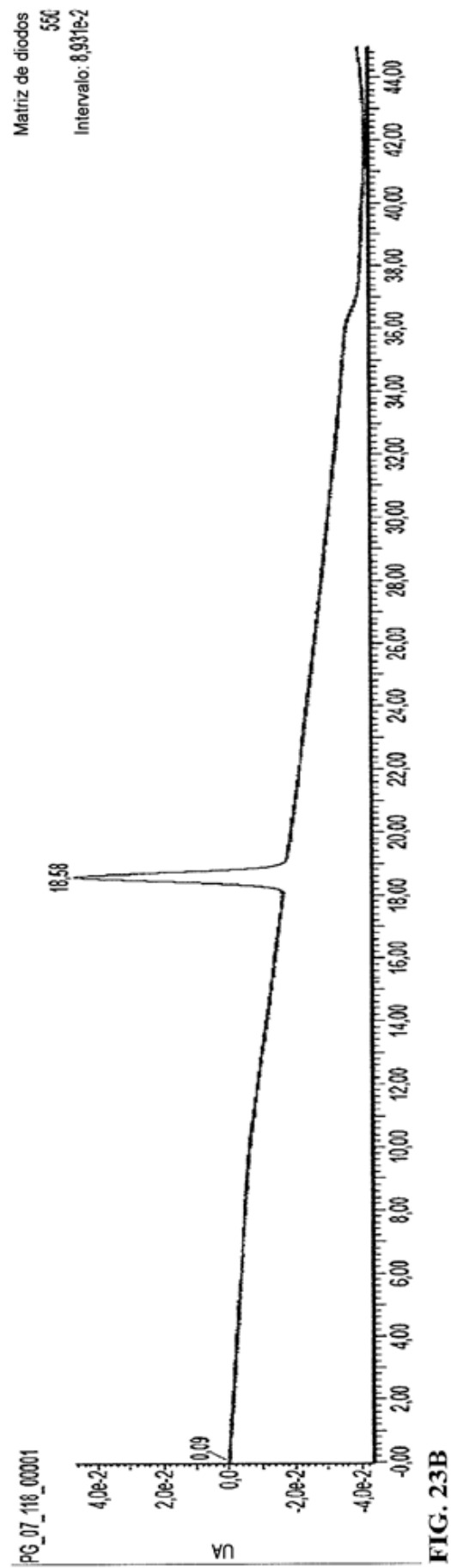


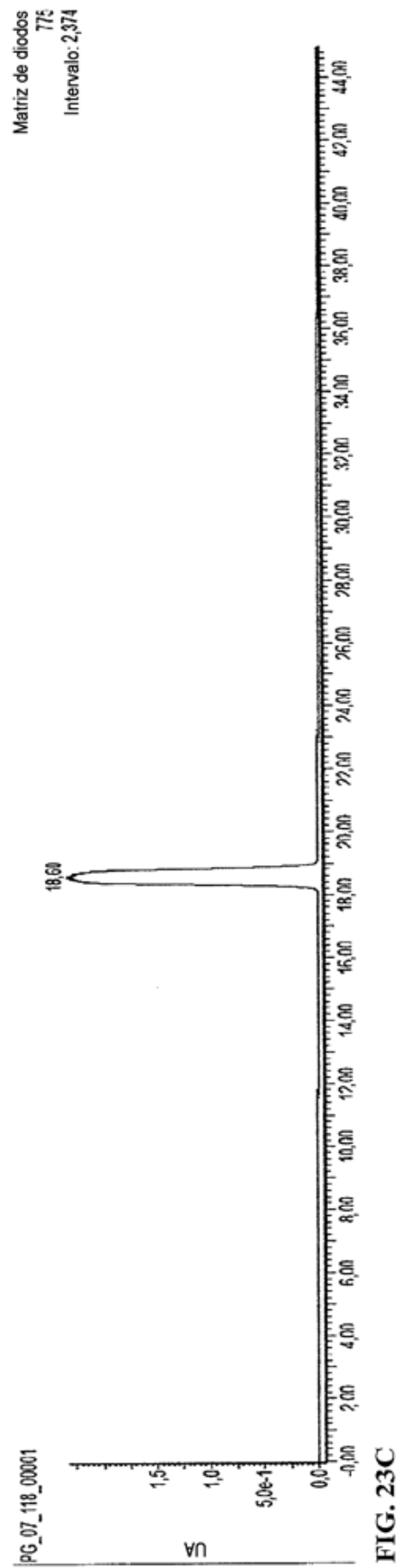


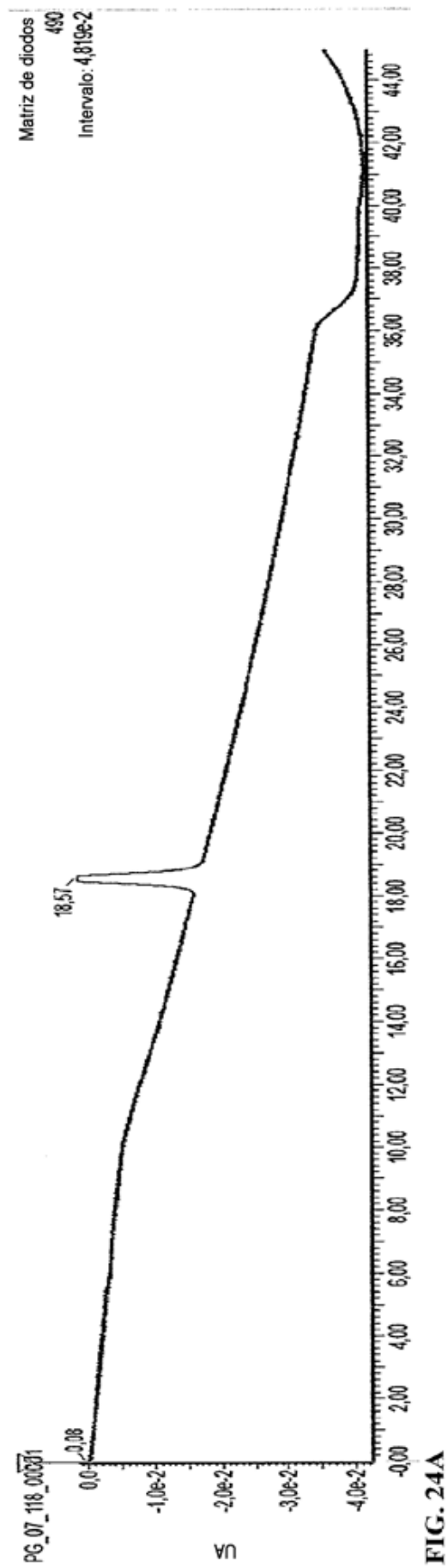


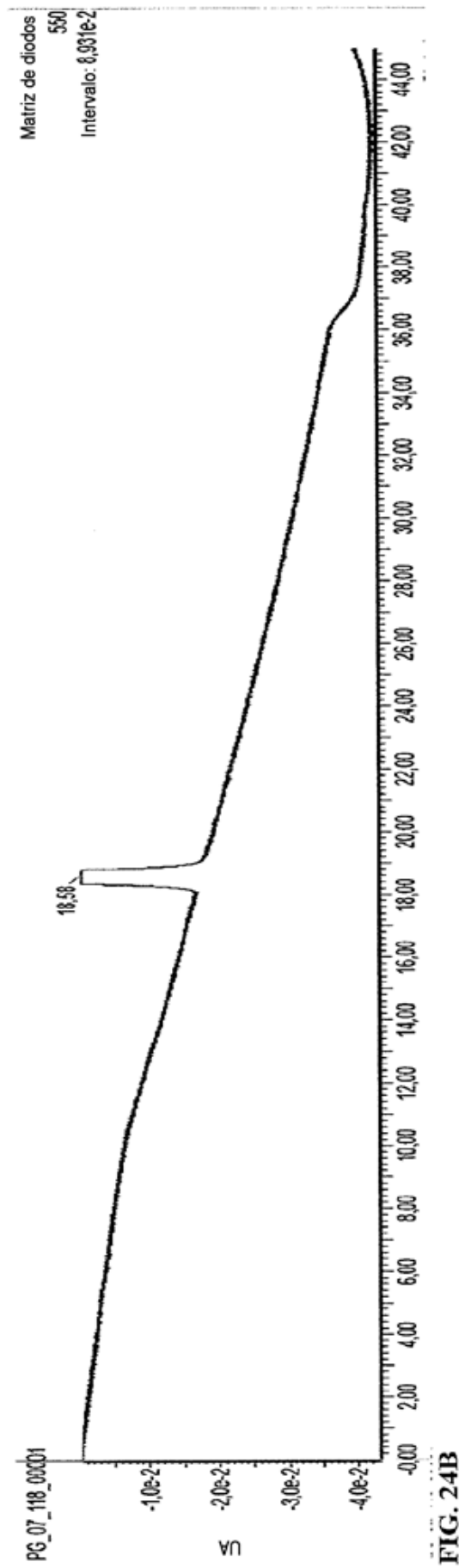


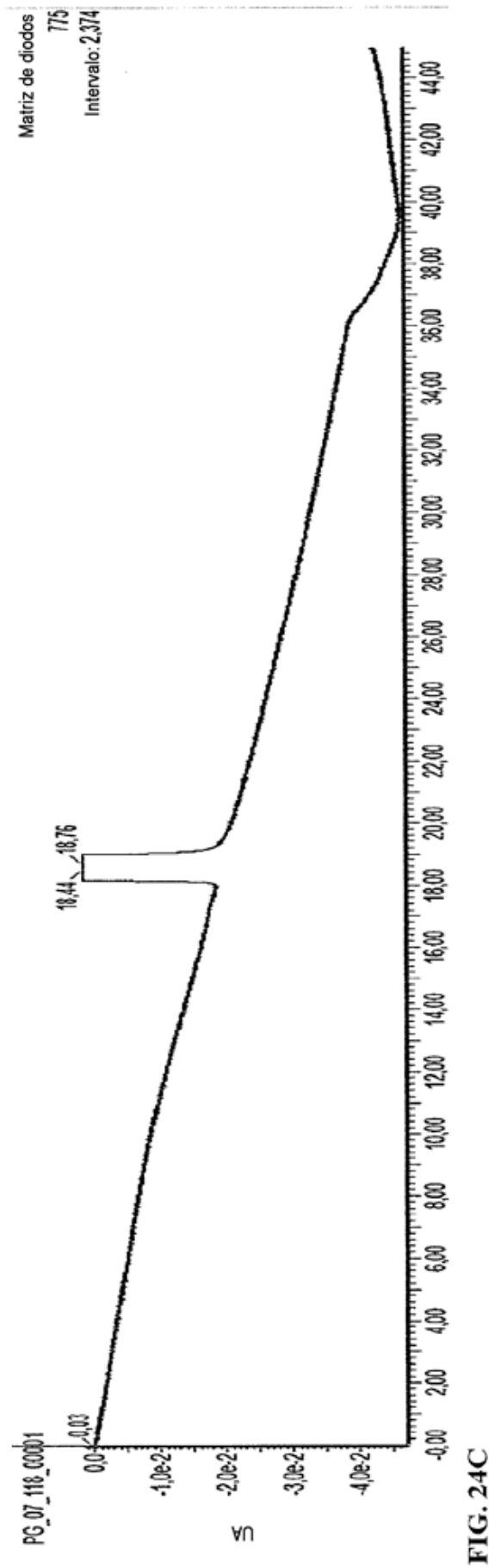












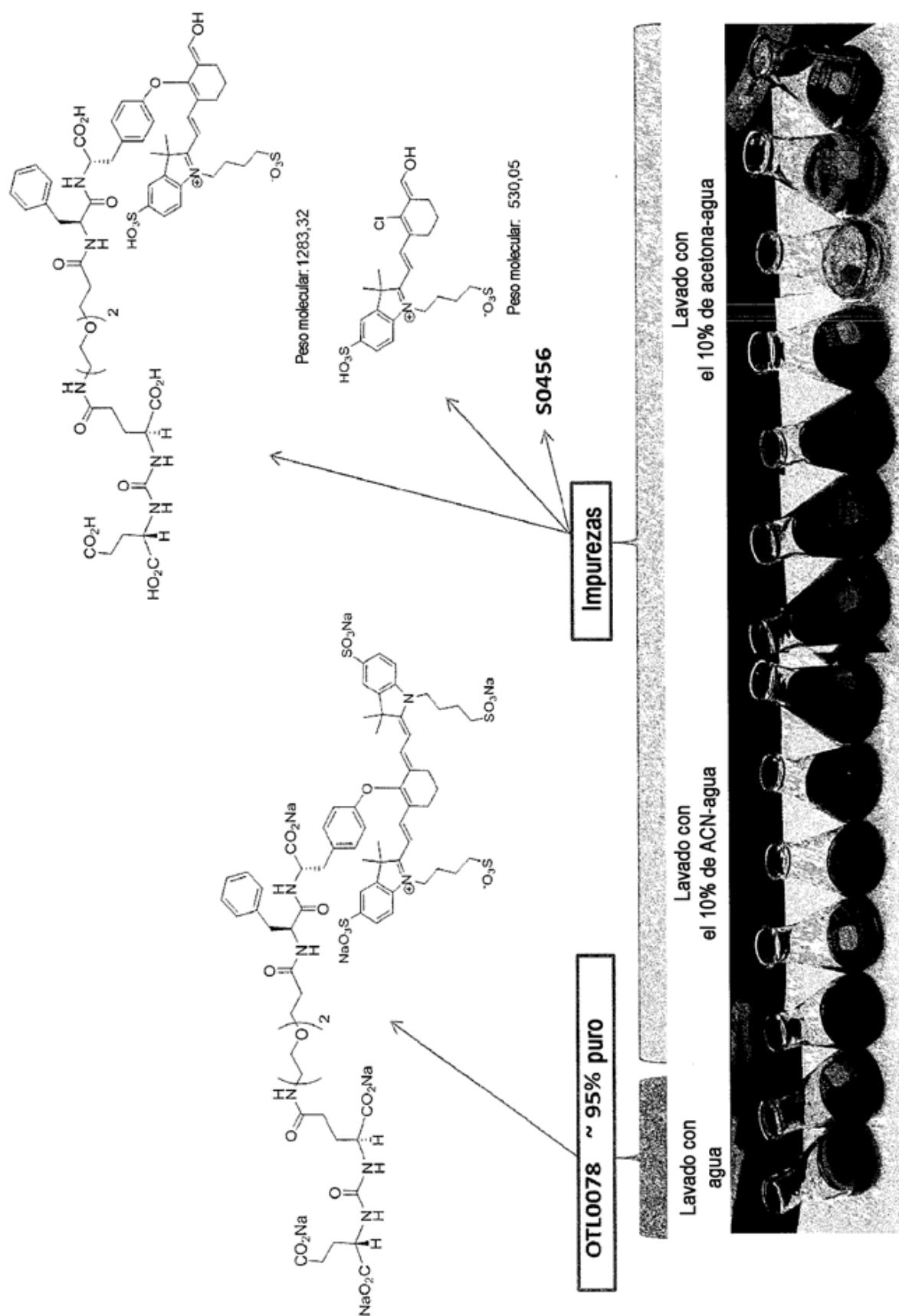


FIG. 25